

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 9 月 12 日 (12.09.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/074736 A1

(51) 国際特許分類: C12Q 1/68, C12N 15/00, A61K
38/45, 45/00, 48/00, 31/7088, A61P 35/00

[JP/JP]; 〒160-8582 東京都 新宿区 信濃町 3 5 番地 慶
應義塾大学医学部内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/02489

(74) 代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒107-0052
東京都 港区 赤坂二丁目 8 番 5 号 若林ビル 3 階 Tokyo
(JP).

(22) 国際出願日: 2003 年 3 月 4 日 (04.03.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-57926 2002 年 3 月 4 日 (04.03.2002) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU,
ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法
人 慶應義塾 (KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒108-8345
東京都 港区 三田二丁目 1 5 番 4 5 号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 戸田 正博
(TODA, Masahiro) [JP/JP]; 〒160-8582 東京都 新宿区
信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP).
河上 裕 (KAWAKAMI, Yutaka) [JP/JP]; 〒160-8582 東
京都 新宿区 信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部
内 Tokyo (JP). 上田 政和 (UEDA, Masakazu) [JP/JP]; 〒
160-8582 東京都 新宿区 信濃町 3 5 番地 慶應義塾
大学医学部内 Tokyo (JP). 大橋 陽平 (OHASHI, Yohei)

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: DIAGNOSTICS AND REMEDIES FOR MALIGNANT BRAIN TUMOR

(54) 発明の名称: 悪性脳腫瘍の診断・治療薬

(57) Abstract: It is intended to provide a diagnosis method and diagnostics for cancers such as human glioma and a therapeutic method and remedies for cancers such as human glioma by identifying tumor suppressive genes or cancer genes useful in diagnosing or treating cancers such as human glioma. Tumor suppressive genes such as RFX1 gene and BGT-1 gene and cancer genes such as HOXD9 gene are screened by comparing a human glioma- or human glioma cell line-origin genomic DNA with a normal tissue-origin genomic DNA in the degree of methylation in CpG island cytosine residues. By targeting these tumor suppressive genes or cancer genes, cancers such as human glioma are diagnosed or treated.

(57) 要約: ヒトグリオーマ等の癌の診断や治療に有用な癌抑制遺伝子あるいは癌遺伝子を同定し、ヒトグリオーマ等の癌の診断方法や診断薬、ヒトグリオーマ等の癌の治療方法や治療薬を提供するものである。ヒトグリオーマ又はヒトグリオーマ細胞株由来のジェノミック DNA と、正常組織由来のジェノミック DNA とにおける CpG アイランドのシトシン残基のメチル化の程度を比較し、RFX1 遺伝子、BGT-1 遺伝子等の癌抑制遺伝子や、HOXD9 遺伝子等の癌遺伝子をスクリーニングする。これら癌抑制遺伝子又は癌遺伝子を標的とすることで、ヒトグリオーマ等の癌の診断又は治療を実施する。

Best Available Copy

WO 03/074736 A1

明 細 書

悪性脳腫瘍の診断・治療薬

5 技術分野

本発明は、ヒトの悪性脳腫瘍であるグリオーマ等の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子のスクリーニング方法、ヒトグリオーマ等の癌の診断方法・診断薬、ヒトグリオーマ等の癌の治療方法・治療薬に関する。

10 背景技術

癌の発生と進展には癌遺伝子や癌抑制遺伝子の異常が深く関係している。とくに p 5 3 などの癌抑制遺伝子が遺伝子の発現を調節するマスター遺伝子であることが明らかとなり、癌抑制遺伝子の異常は癌化において極めて重要な役割を果たしていると考えられている。最近、癌の発症

15 に DNA メチル化に関わることが報告されている (Adv.Cancer Res., 72, 141-196, 1998)。また、癌抑制遺伝子の不活性化の機構として、ジェノミック DNA の異常メチル化が注目されている。遺伝子の近傍 5' 部位の CpG 配列に富む領域は CpG アイランドと呼ばれ、通常ヒトゲノム中の CpG 配列の多くはメチル化されているが、正常組織における Cp

20 G アイランド中の CpG 配列は、遺伝子の発現の有無にかかわらずメチル化を受けていない。しかし、癌においては CpG アイランドがメチル化され、様々な遺伝子の発現が抑制・消失している。メチル化された CpG アイランドには MeCP2 (methyl CpG binding repressor 2) と呼ばれるメチル化 CpG 結合タンパク質が結合し、ヒストン脱アセチル

25 化酵素やクロマチン再構築因子の複合体をメチル化領域にリクルートする。その結果、周辺のクロマチン構造が縮合型に変化し、RNA ポリメ

ラーゼや転写因子がプロモーター領域に入っていけなくなるため、転写発現が低下する (J.Biochem., 125, 217-222, 1999)。

近年、メチル化されている CpG アイランドを同定する手法として、メチル化感受性制限酵素 Not I を利用した R L G S (restriction landmark genome scanning) 法が開発されている。

本発明の課題は、ヒトグリオーマ等の癌の診断や治療に有用な癌抑制遺伝子あるいは癌遺伝子を同定し、ヒトグリオーマ等の癌の診断方法や診断薬、ヒトグリオーマ等の癌の治療方法や治療薬を提供することにある。

10

発明の開示

本発明者らは、メチル化感受性制限酵素を用いた R L G S 法により、グリオーマにおけるメチル化の異常を解析し、グリオーマにおける R F X 1 および B G T - 1 遺伝子の発現が減少あるいは消失することや、H O X D 9 遺伝子が異所性にグリオーマにおいて発現していることなどを見い出した。この結果、上記 R L G S 法で同定された遺伝子のグリオーマを含む癌の診断、治療薬としての有用性が明らかになり、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、ヒトグリオーマ又はヒトグリオーマ細胞株由来のジェノミック DNA と、正常組織由来のジェノミック DNA とにおける CpG アイランドのシトシン残基のメチル化の程度を比較することを特徴とする癌抑制遺伝子又は癌遺伝子のスクリーニング方法 (請求項 1) や、癌抑制遺伝子又は癌遺伝子が、ヒトグリオーマの癌抑制遺伝子又は癌遺伝子であることを特徴とする請求項 1 記載の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子のスクリーニング方法 (請求項 2) や、ヒトグリオーマの癌抑制遺伝子が、R F X 1 遺伝子又は B G T - 1 遺伝子であることを特徴とする

請求項 2 記載の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子のスクリーニング方法（請求項 3）や、RFX1 遺伝子として、RFX1 遺伝子第 7 イントロンを用いることを特徴とする請求項 3 記載の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子のスクリーニング方法（請求項 4）や、ヒトグリオーマの癌遺伝子が、HOXD1、HOXD3、HOXD4、HOXD8、HOXD9、HOXD10、HOXD13、HOXA9、HOXB9 又は HOXC9 等の HOX 遺伝子であることを特徴とする請求項 2 記載の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子のスクリーニング方法（請求項 5）や、請求項 1～5 のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子の、メチル化の程度、遺伝子変異の有無、遺伝子発現の程度、タンパク質発現の程度の少なくともいずれか 1 つを測定することを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の診断方法（請求項 6）や、請求項 1～5 のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子の、メチル化の程度、遺伝子変異の有無、遺伝子発現の程度、タンパク質発現の程度の少なくともいずれか 1 つを測定することができる試薬を備えたことを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の診断薬（請求項 7）や、請求項 1～4 のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌抑制遺伝子を癌細胞で発現させるか、あるいは、前記癌抑制遺伝子の発現産物、メチル基転移酵素阻害剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の少なくともいずれか 1 つを癌患者に投与することを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の治療方法（請求項 8）や、請求項 1～4 のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌抑制遺伝子、前記癌抑制遺伝子の発現産物、メチル基転移酵素阻害剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の少なくともいずれか 1 つを含有することを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の治療薬（請求項 9）や、請求項 1、2 又は 5 記載のスクリ

- ーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌遺伝子の発現抑制剤又は該癌遺伝子の発現産物に特異的に結合するペプチド・タンパク質等の化合物を癌患者に投与することを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の治療方法（請求項10）や、請求項1、2又は5記載のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌遺伝子の発現抑制剤又は該癌遺伝子の発現産物に特異的に結合するペプチド・タンパク質等の化合物を含有することを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の治療薬（請求項11）や、請求項1～5のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子を標的としたことを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の診断又は治療方法（請求項12）や、RFX1遺伝子又はHox遺伝子群を標的としたことを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の診断又は治療方法（請求項13）や、請求項1～5のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子を標的としたことを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の診断又は治療薬（請求項14）や、RFX1遺伝子又はHox遺伝子群を標的としたことを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の診断又は治療薬（請求項15）に関する。

図面の簡単な説明

- 20 第1図、AはRLGSプロファイルによるスポットを観察した結果を示す図であり、BはRLGS解析の結果、信号強度の減少あるいは欠失したスポットを示す図である。
- 第2図は、RLGSクローンをBLASTサーチ検索にかけた結果を示す図である。
- 25 第3図は、正常組織、グリオーマ組織及びグリオーマ細胞株におけるRFX1遺伝子の発現の有無をRT-PCR法によって解析した図であ

る。

第4図は、正常組織、グリオーマ組織及びグリオーマ細胞株におけるBGT-1遺伝子の発現の有無をRT-PCR法によって解析した図である。

5 第5図は、正常組織、グリオーマ組織及びグリオーマ細胞株におけるHDXD9遺伝子の発現の有無をRT-PCR法によって解析した図である。

第6図は、薬剤処理を行ったヒトグリオーマ細胞株(U251)におけるRFX1遺伝子の発現状態の変化をRT-PCR法により解析した
10 図である。

第7図は、4種類のグリオーマ細胞株におけるBGT-1遺伝子の5-アザシチジン及びトリコスタチンA処理による発現状態の相違をRT-PCR法によって解析した図である。

第8図は、RFX1遺伝子の第7イントロンのCpGを示す図である。
15 である。

第9図は、正常ヒト脳組織及び正常ヒトリンパ球のRFX1遺伝子第7イントロンのCpGのメチル化を、バイサルファイト・ジェノミック・シーケンシングによって解析した図である。

第10図は、ヒトグリオーマ細胞株のRFX1遺伝子第7イントロンの
20 CpGのメチル化を、バイサルファイト・ジェノミック・シーケンシングによって解析した図である。

第11図は、ヒトグリオーマ組織のRFX1遺伝子第7イントロンのCpGのメチル化を、バイサルファイト・ジェノミック・シーケンシングによって解析した図である。

25 第12図は、RFX1遺伝子第7イントロンのエンハンサー活性を、ルシフェラーゼアッセイによって解析した図である。

第 1 3 図、A は U 2 5 1 グリオーマ細胞における R F X 1 の発現を、抗 R F X 1 抗体を用いたウエスタンブロット法により確認した図であり、B は [³H] チミジンの取り込み量を指標とした細胞増殖の解析結果を示す図である

5 第 1 4 図は、正常脳組織及び種々のグリオーマ細胞株における H O X D 8 遺伝子の発現状態を R T - P C R 法によって解析した図である。

第 1 5 図は、正常脳組織及び種々のグリオーマ細胞株における H O X A 9、H O X B 9、H O X C 9 遺伝子の発現状態を R T - P C R 法によって解析した図である。

10 第 1 6 図は、正常脳組織並びに種々のグリオーマ細胞株及びグリオーマ組織における H O X D 群遺伝子の発現状態を R T - P C R 法によって解析した図である。

発明を実施するための最良の形態

15 本発明の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子のスクリーニング方法としては、ヒトグリオーマ又はヒトグリオーマ細胞株由来のジェノミック DNA と、正常組織由来のジェノミック DNA とにおける C p G アイランドのシトシン残基のメチル化の程度を比較する方法であれば特に制限されるものではなく、上記スクリーニングの対象となる癌抑制遺伝子としては、R
20 F X 1 遺伝子、B G T - 1 遺伝子等のヒトグリオーマなどの癌抑制遺伝子を挙げることができ、癌遺伝子としては、H O X (H O X D 1、H O X D 3、H O X D 4、H O X D 8、H O X D 9、H O X D 1 0、H O X D 1 3、H O X A 9、H O X B 9、H O X C 9 等) 遺伝子等のヒトグリ
25 オーマなどの癌遺伝子を挙げることができる。また、上記 R F X 1 遺伝子として、R F X 1 遺伝子第 7 イントロンを特に有利に用いることができる。

CpGアイランドのシトシン残基のメチル化の状態を調べる方法としては、メチル化感受性制限酵素を用いる方法（Nucleic Acids Res., 26, 2255-2264, 1998）、ヒドラジンや過マンガン酸や重亜硫酸ナトリウムによる化学修飾を用いる方法、メチル化DNAに特異的な抗体を用いた免疫学的方法（Nucleic Acids Res., 26, 2255-2264, 1998）、MeCP2などのMBD（methyl-CpG binding domain）を用いたアフィニティ・カラム法およびDGGE（denaturing gradient gel electrophoresis）法（Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 96, 2913-2918, 1999）など、公知の方法を含め、CpGアイランドのシトシン残基のメチル化の程度を調べる方法であれば特に制限されないが、メチル化感受性酵素 Not I を用いた R L G S 解析を好適に挙げることができる。

本発明のヒトグリオーマ等の癌の診断方法としては、上記のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子を標的とした癌の診断方法であれば特に制限されるものではなく、例えば、RFX1 遺伝子等の上記癌抑制遺伝子、又はH O X 遺伝子群等の癌遺伝子の、メチル化の程度、遺伝子発現の有無、遺伝子発現の程度、タンパク質発現の程度の少なくともいずれか1つを測定する方法を挙げることができる。特に、RFX1 遺伝子、好ましくはRFX1 遺伝子第7イントロンは、ヒトグリオーマの診断方法において有用である。上記メチル化の程度を測定する方法としては、前記CpGアイランドのシトシン残基のメチル化の状態を調べる方法を例示することができ、遺伝子発現の有無を調べる方法としては、PCR-SSCP法やDNAシーケンスを比較する方法を例示することができ、遺伝子発現の程度を測定する方法としては、前記癌抑制遺伝子又は癌遺伝子に特異的なプライマーを用いるRT-PCR法等を例示することができ、タンパク質発現の程度を測定する方法としては、前記癌抑制遺伝子又は癌遺伝子の発現産物

に対するモノクローナル抗体を用いるウエスタンブロット法等を例示することができる。かかる診断方法に用いられる検体としては、被験者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織等の生検から得ることができるジェノミックDNAや、RNA、cDNA又はタンパク質を具体的に挙げる
5 ことができるがこれらに限定されるものではない。

本発明のヒトグリオーマ等の癌の診断薬としては、上記のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子を標的とした癌の診断薬であれば特に制限されるものではなく、例えば、RFX1遺伝子等の上記癌抑制遺伝子、又はHMX遺伝子群等の癌遺伝子の、メチル化の程度、遺伝子発現の有無、遺伝子発現の程度、タンパク質発現の程度の少なくともいずれか1つを測定することができる試薬を備えたものを挙げる
10 ことができる。特に、RFX1遺伝子、好ましくはRFX1遺伝子第7イントロンは、ヒトグリオーマの診断薬において有用である。上記メチル化の程度を測定することができる試薬としては、
15 例えばメチル化感受性酵素とRLGS解析用試薬を例示することができ、遺伝子発現の有無を測定することができる試薬としては、PCR-SSCP解析用試薬を例示することができ、遺伝子発現の程度を測定することができる試薬としては、前記癌抑制遺伝子又は癌遺伝子に特異的なプライマーとRT-PCR用試薬等を例示することができ、タンパク質発
20 現の程度を測定することができる試薬としては、前記癌抑制遺伝子又は癌遺伝子の発現産物に対するモノクローナル抗体と標識化2次抗体等のウエスタンブロット用試薬などを例示することができる。

本発明のヒトグリオーマ等の癌の治療方法としては、上記のスクリーニング方法により得られるRFX1遺伝子、BGT-1遺伝子等の癌抑制遺伝子を標的としたヒトグリオーマ等の癌の治療方法であれば特に制限されるものではなく、また、本発明のヒトグリオーマ等の癌の治療薬
25

としては、上記のスクリーニング方法により得られる R F X 1 遺伝子、
B G T - 1 遺伝子等の癌抑制遺伝子を標的としたヒトグリオーマ等の癌
の治療方法であれば特に制限されるものではないが、上記 R F X 1 遺伝
子は、ヒトグリオーマの治療方法や治療薬において特に有用である。上
5 記 R F X 1 遺伝子、B G T - 1 遺伝子等の癌抑制遺伝子を標的としたヒ
トグリオーマ等の癌の治療方法としては、例えば、R F X 1 遺伝子、B
G T - 1 遺伝子等の癌抑制遺伝子を癌細胞で発現させるか、あるいは、
前記癌抑制遺伝子の発現産物、メチル基転移酵素阻害剤、ヒストン脱ア
セチル化酵素阻害剤の少なくともいずれか 1 つを癌患者に投与する方法
10 を挙げることができる。また、上記 R F X 1 遺伝子、B G T - 1 遺伝子
等の癌抑制遺伝子を標的としたヒトグリオーマ等の癌の治療薬としては、
例えば、R F X 1 遺伝子、B G T - 1 遺伝子等の癌抑制遺伝子、好まし
くは癌抑制遺伝子を含む発現ベクター、あるいは、前記癌抑制遺伝子の
発現産物、メチル基転移酵素阻害剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤
15 の少なくともいずれか 1 つを含有するものであれば特に制限されるもの
ではない。

遺伝子治療として、上記 R F X 1 遺伝子、B G T - 1 遺伝子等の癌抑
制遺伝子を含む発現ベクターを局所投与する場合、前記癌抑制遺伝子の
発現産物を有効成分とする治療薬を局所投与する場合に比べて、癌抑制
20 遺伝子の安定した発現により、癌抑制遺伝子の発現産物を局所に安定的
に供給することが可能になる。例えば、発現ベクターを用いて、ヒトグ
リオーマ細胞へ癌抑制遺伝子を導入することにより、所定の期間の安定
した発現を得ることができる。このようなベクターとしては、ヘルペス
ウイルス (H S V) ベクター、アデノウイルスベクター、ヒト免疫不全
25 ウイルス (H I V) ベクター、サイトメガロウイルス (C M V) ベクタ
ー等のウイルスベクターを好適に挙げることができるが、これらウイル

スベクターの中でもHSVベクターやCMVベクターが好ましい。特に、HSVベクターは、HSVが細胞のジェノミックDNAに組み込まれないため安全であり、また、導入遺伝子の発現期間を調節することが可能である。また、これら癌抑制遺伝子を含む発現ベクターは、常法により

5 調製することができる。

ヒトグリオーマの治療薬としてのメチル基転移酵素阻害剤としては、5-アザシチジン、5-アザ-2'-デオキシシトジン、S-アデノシルホモシステイン等の化合物を挙げることができ、また、ヒトグリオーマの治療薬としてのヒストン脱アセチル化酵素阻害剤としては、酪酸、微生物代謝産物のトリコスタチンA (J. Biol. Chem. 265, 17174-17179, 1990) やトラボキシン (J. Biol. Chem. 268, 22429-22435, 1993)、Depudecin (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 3356-3361, 1998)、フェニル酪酸 (J. Natl. Cancer Inst. 90(21), 1621-1625, 1998)、FR-901228 (Exp. Cell Res. 241, 126-133, 1998)、MS-27-275 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4592-4597, 1999)、ベンズアミド誘導体 (特開平11-335375号広報)、ジチオール誘導体 (特開2001-354694号広報) などの化合物を挙げることができる。

本発明の他の態様のヒトグリオーマ等の癌の治療方法としては、上記のスクリーニング方法により得られるH O X遺伝子等の癌遺伝子を標的としたヒトグリオーマ等の癌の治療方法であれば特に制限されるものではなく、また、本発明の他の態様のヒトグリオーマ等の癌の治療薬としては、上記のスクリーニング方法により得られるH O X遺伝子等の癌遺伝子を標的としたヒトグリオーマ等の癌の治療薬であれば特に制限されるものではない。上記H O X遺伝子等の癌遺伝子を標的としたヒトグリオーマ等の癌の治療方法としては、上記癌遺伝子の発現抑制剤や上記癌遺伝子の発現産物に特異的に結合するペプチド・タンパク質等の化合物

を癌患者に投与する方法を挙げることができ、また、本発明の他の態様のヒトグリオーマ等の癌の治療薬としては、上記癌遺伝子の発現抑制剤や上記癌遺伝子の発現産物に特異的に結合するペプチド・タンパク質等の化合物を含有するものであれば特に制限されるものではない。

- 5 上記癌遺伝子の発現抑制剤としては、例えば癌遺伝子DNA又はそのmRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部を挙げることができるが、20bp以上からなるDNA又はRNAが好ましい。かかるアンチセンス鎖の局所への投与は、前記のようにウイルスベクターを用いることができるが、ヒトグリオーマ等の癌細胞に対するモノクローナル抗体を用い
- 10 ることにより、選択的にグリオーマ等にアンチセンス鎖を導入させることもできる。また、上記癌遺伝子の発現産物に特異的に結合するペプチド・タンパク質等の化合物としては、癌遺伝子の発現産物に対するモノクローナル抗体等の抗体やその可変領域などを挙げることができる。

- 上記本発明の癌の治療薬には、薬学的に許容される通常の担体、結合
- 15 剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、pH緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤などの各種調剤用配合成分を適宜添加することができる。またかかる治療薬は、経口的又は非経口的に投与することができる。すなわち通常用いられる投与形態、例えば粉末、顆粒、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液等の剤型で経口的に投与することができ、あるいは、例
- 20 えば溶液、乳剤、懸濁液等の剤型にしたものを注射の型で非経口に局所に投与することができる他、スプレー剤の型で鼻孔内投与することもできる。本発明のこれら治療薬の投与量は、用法、患者の年齢、性別、疾患の程度およびその他の条件により適宜選択されるが、通常有効成分化合物の量としては、体重1kg当り、1日約0.0001～100mg
- 25 程度とするのがよい。また投与単位形態の製剤中には有効成分化合物が約0.001～1,000mgの範囲で含有されることが望ましい。

以上、本発明の癌の診断・治療方法、診断・治療薬における癌がヒト悪性脳腫瘍であるヒトグリオーマについて主として述べてきたが、本発明の対象となる癌はグリオーマに限定されるものでなく、ヒトのグリオーマの他、子宮頸癌、上皮様癌、T細胞腫、前骨髄性白血病、食道癌、
5 膀胱癌、悪性黒色腫、肺癌、口腔癌、乳癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、神経芽細胞腫、大腸癌などを例示することができる。

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

10 実施例 1 [材料と方法]

実施例 1 A (細胞株、腫瘍)

ヒトグリオーマ細胞株である T 9 8 G、U 8 7 M G、A 1 7 2 はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (A T C C) から、U 2 5 1、G I - 1 は理研ジーンバンクから購入したものをを用いた。これらの
15 グリオーマ細胞株は牛胎児血清を 1 0 % 添加した D M E M 培地を用いて培養した。ヒトグリオーマ組織 (G B 4、G B 1 3、G B 1 6、G B 1 7、G B 2 6、G B 3 0) は同意を得られた患者の手術時に摘出された病変の一部を用いた。ヒトグリオーマ組織 (G B 2 6 及び G B 3 0)、同患者の血液、また同意を得た健常人の血液から高分子量のジェノミック
20 D N A を調製した。

実施例 1 B (メチル化感受性酵素 Not I を用いた R L G S 解析)

基本的に R L G S は林崎らの方法 (Electrophoresis, 16, 1995) に従って行った。腫瘍組織および血液から抽出されたジェノミック D N A をメチル化感受性酵素 Not I で切断した後、末端を ^{32}P にて標識した。さら
25 らに制限酵素 Pvu II で切断した後、アガロースゲルを用いて一次元目の電気泳動を行った。続いて、アガロースゲルを制限酵素 Pst I を含む溶

液中で酵素処理を行った後、ポリアクリルアミドゲルを用いて二次元目の電気泳動を行った。泳動後、ポリアクリルアミドゲルを乾燥させて、オートラジオグラフィーを行い、標識されたDNA断片を可視化した。

実施例 1 C (DNA断片の単離とジェノミック・シーケンシング)

- 5 ヒトグリオーマ由来DNAと同じ患者の血液由来DNAとのRLGSプロファイルを比較して、グリオーマ2例で共通して発現が減少あるいは消失していたスポットを、ヒト胎盤由来DNAのRLGSゲルから単離した。切り出したDNA断片をゲルから溶出後、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールによりDNAを抽出した。抽出されたDNA
- 10 NAをNot IおよびPst Iアダプターと結合させて、アダプターに特異的なプライマーを用いてPCRで増幅した。シーケンス反応はBig Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(PE Applied Biosystems 社製)を用いて行い、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzerにより解析した。DNAが微量で直接シーケンスができなかった場合、PCR産物をpGEM-T Easy vector(プロメガ社製)にサブクローニングした後、シーケンシングを行った。得られた配列をNational Center for Biotechnology Information(NCBI)のデータベースを利用して、塩基配列の相同性を解析した。
- 15

実施例 1 D (RNA調製とRT-PCR)

- 20 ヒトグリオーマ組織(GB4、GB13、GB16、GB17)とヒトグリオーマ細胞株由来の全RNAはTrizol(ギブコ社製)を用いて抽出し、正常組織の全RNAはクローンテック社より購入した。cDNAの合成は10 μ gの全RNAより、逆転写酵素XL(AMV)(宝酒造社製)を用いて行い、最終量は100 μ lとした。1 μ lのcDNA鋳型
- 25 を用いてTakara Taq™(宝酒造社製)を用いて総量25 μ lの系でPCRを行った。反応液には2.5 μ lの10 \times PCR-Buffer [1

00mM Tris-HCl (pH 8.3)、500mM KCl、15mM MgCl₂]と2μlの deoxyribonucleotide triphosphate mixture (2.5mM each)と、0.1μMのプライマーを添加した。

- 5 プライマーの塩基配列としては、RFX1遺伝子についてはセンスプライマー [5'-GAA GAT GGA AGG CAT GAC C-3' (配列番号1)] とアンチセンスプライマー [5'-GGC TCT TGG CAA AGT TCC-3' (配列番号2)] を用い、HOXA9遺伝子についてはセンスプライマー [5'-CGA AGG CGC CTT CTC CGA AA-3' (配列番号3)] とアンチセンスプライマー [5'-AAA TGG CAT CAC TCG TCT
- 10 TTT GCT C-3' (配列番号4)] を用い、HOXB9遺伝子についてはセンスプライマー [5'-CAC GCC CGA GTA CAG TTT GG-3' (配列番号5)] とアンチセンスプライマー [5'-GAC TTG TCT CTC ACT CAG ATT GAG G-3' (配列番号6)]を用い、HOXC9遺伝子についてはセンスプライマー [5'-GGC AGC AAG CAC AAA GAG GA-3' (配列番号7)] とアンチセンスプライマー [5'-AGG CTG GGT
- 15 AGG GTT TAG GAC-3' (配列番号8)] を用い、HOXD9遺伝子についてはセンスプライマー [5'-CTT GAC CCA AAC AAC CCC-3' (配列番号9)] とアンチセンスプライマー [5'-CTC TCT GTT AGG TTG AGA ATC C-3' (配列番号10)]を用い、HOXD8遺伝子についてはセンスプライマー [5'-GCC AGG AGT ACT TCC ACC-3' (配列番号11)] とアンチセンスプライマー [5'-GTT TCC CCG
- 20 TCC TTC ACC-3' (配列番号12)] を用い、BGT-1遺伝子についてはセンスプライマー [5'-GAG CAT TGC ACG GAC TTT CTG AAC C-3' (配列番号13)] とアンチセンスプライマー [5'-CCA GGA TGG AGA AGA CAA CAA ACC C-3' (配列番号14)]を用い、GAPDHについてはセンスプライマー [5'-TGA ACG GGA AGC TCA CTG G-3' (配列番号15)] とアンチセンスプライマー [5'-TCC ACC
- 25 ACC CTG TTG CTG TA-3' (配列番号16)] を用い、β-actinについてはセンスプライマー [5'-GTC GAC AAC GGC TCC GGC ATG TGC-3' (配列番号17)]

とアンチセンスプライマー [5'-GGA TCT TCA TGA GGT AGT CAG TCA G-3' (配列番号 18)] を用いた。

また、PCR は以下の反応条件で行った。

- ① RFX1 については、94℃で5分間変性させた後、94℃で1分間変性させ、57℃で1分間アニーリングし、72℃で1分間伸長反応させるというサイクルを30回繰返し、最後に72℃で7分間伸長反応を行った。
- ② HOXA9、B9 及び C9 については、94℃で5分間変性させた後、94℃で1分間変性させ、62℃で1分間アニーリングし、72℃で1分間伸長反応させるというサイクルを35回繰返し、最後に72℃で7分間伸長反応を行った。
- ③ HOXD9 については、94℃で5分間変性させた後、94℃で1分間変性させ、57℃で1分間アニーリングし、72℃で1分間伸長反応させるというサイクルを35回繰返し、最後に72℃で7分間伸長反応を行った。
- ④ HOXD8 については、94℃で5分間変性させた後、94℃で1分間変性させ、58℃で1分間アニーリングし、72℃で2分間伸長反応させるというサイクルを35回繰返し、最後に72℃で7分間伸長反応を行った。
- ⑤ BGT1 については、94℃で5分間変性させた後、94℃で1分間変性させ、65℃で1分間アニーリングし、72℃で2分間伸長反応させるというサイクルを35回繰返し、最後に72℃で7分間伸長反応を行った。
- ⑥ GAPDH については、94℃で5分間変性させた後、94℃で1分間変性させ、58℃で1分間アニーリングし、72℃で1分間伸長反応させるというサイクルを25回繰返し、最後に72℃で7分間伸長反応を行った。
- ⑦ β -actin については、94℃で5分間変性させた後、94℃で1分間変性させ、68℃で1分間アニーリングし、72℃で2分間伸長反応させるというサイクルを20回繰返し、最後に72℃で7分間伸長反応を行った。

得られた各 PCR 産物を 2% のアガロースゲルで電気泳動し、エチジ

ウムブロマイドで染色して解析した。

さらにH O X D 群遺伝子のグリオーマにおける発現を網羅的に解析した。プライマーの塩基配列としては、H O X D 1 遺伝子についてはセンスプライマー[5'-ACC CCA AGT CCG TCT CTC-3' (配列番号 2 3)]とアンチセンスプライマー[5'-AGC AGT TGG CTA TCT CGA TG-3' (配列番号 2 4)]を用い、H O X D 3 遺伝子についてはセンスプライマー[5'-CCA TCA GCA AGC AGA TCT TCC-3' (配列番号 2 5)]とアンチセンスプライマー[5'-TCT TGA TCT GGC GTT CCG T-3' (配列番号 2 6)]を用い、H O X D 4 遺伝子についてはセンスプライマー[5'-GGA TGA AGA AGG TGC ACG TGA ATT CGG-3' (配列番号 2 7)]とアンチセンスプライマー[5'-GGG TCC CCA CTT CTA TAA GGT CGT CA-3' (配列番号 2 8)]を用い、H O X D 9 遺伝子についてはセンスプライマー [5'-CTT GAC CCA AAC AAC CCC-3' (配列番号 9)] とアンチセンスプライマー [5'-CTC TCT GTT AGG TTG AGA ATC C-3' (配列番号 1 0)] を用い、H O X D 1 0 遺伝子についてはセンスプライマー[5'-CCA AGG CGG CCT TCC CGA AGA-3' (配列番号 2 9)]とアンチセンスプライマー[5'-TCG GCG GTT TTG AAA CCA AAT CTT GAC C-3' (配列番号 3 0)]を用い、H O X D 1 3 遺伝子についてはセンスプライマー[5'-GGC CTA CAT CTC CAT GGA GGG GTA CCA-3' (配列番号 3 1)]とアンチセンスプライマー[5'-GTG GCC AAC CTG GAC CAC ATC AGG AG-3' (配列番号 3 2)]を用いた。また、P C R 反応条件は次の通りである：9 4 ℃で5 分間変性させた後、9 4 ℃で1 分間変性させ、各T M 値で1 分間アニーリングし、7 2 ℃で1 分間伸長反応させるというサイクルを3 5 回繰返し、最後に7 2 ℃で7 分間伸長反応を行った。各T M 値は、H O X D 1 及びD 3 が6 0 ℃、H O X D 4 が6 6 ℃、H O X D 9 が5 7 ℃、H O X D 1 0 が6 7 ℃、H O X D 1 3 が7 0 ℃である。

実施例 1 E (5-アザシチジン及びトリコスタチン A 処理)

ヒトグリオーマ細胞株を低密度で培養し、24 時間後に 5-アザシチジン (メチル基転移酵素阻害剤) (シグマ社製) を 500 nM になるように加えた。5-アザシチジン入りの培養液は 24 時間ごとに取り替え、

- 5 3 日間培養し、最後の 24 時間にトリコスタチン A (ヒストン脱アセチル化阻害剤) (和光社製) を 50 ng/ml になるように添加した。その後 Trizol を用いて全 RNA を抽出し、cDNA 合成後、PCR を行い、各薬剤による遺伝子発現の変化を解析した。

実施例 1 F (バイサルファイト・ジェノミック・シーケンシング)

- 10 1 µg のジェノミック DNA から、CpGenome DNA Modification Kit (Intergen 社製) を用いて、バイサルファイト変換を行った。この過程で非メチル化シトシンはウラシルに変化し、メチル化シトシンは変化しない。処理した DNA は 50 µl の蒸留水に溶解させ、これを鋳型として、RFX1 遺伝子の第 7 イントロンに特異的なプライマーを用いて
- 15 まず 1 回目の PCR を行った。ここで用いたプライマー配列は以下の通りである。RFX1-第 7 イントロンセンスプライマー 1 : 5'-GGT TTT GGG TTA GTT TTA ATT TTT-3' (配列番号 19)、RFX1-第 7 イントロンアンチセンスプライマー 1 : 5'-TTC TCT AAA TCC TAA CCC TCT AA-3' (配列番号 20)。PCR 反応条件は次の通りである : 98 °C で 5 分間変
- 20 性させた後、98 °C で 1 分間変性させ、50 °C で 2 分間アニーリングし、72 °C で 2 分間伸長反応させるというサイクルを 45 回繰返し、最後に 72 °C で 7 分間伸長反応を行った。さらに 1 回目の PCR 産物を用いて、Nested PCR を行った。鋳型としては 1 回目の PCR 産物を 25 倍希釈したものを 1 µl 用いた。プライマー配列は次の通りである。RFX1
- 25 -第 7 イントロンセンスプライマー 2 : 5'-GGT GGA GGT TTG GAG TTT-3' (配列番号 21)、RFX1-第 7 イントロンアンチセンスプライマー

2 : 5'-ACA AAA ACA AAT ATA AAA ACA ACA-3' (配列番号 2 2)。また、P
C R の条件は次の通りである : 9 8℃で 5 分間変性させた後、9 8℃で
1 分間変性させ、5 0℃で 1 分間アニーリングし、7 2℃で 1 分間伸長
5 反応させるというサイクルを 4 5 回繰返し、最後に 7 2℃で 7 分間伸長
反応を行った。この P C R 産物は pGEM-T Easy Vector (プロメガ社製)
にサブクローニングした後、T 7 プライマーを用い、シークエンシング
を行った。

10 以上のバイサルファイト・ジェノミック・シークエンシングを用いて、
ヒトグリオーマ細胞株 (U 2 5 1、G I - 1、T 9 8 G、U 8 7 M G)、
ヒトグリオーマ組織 (4 例)、正常ヒト脳組織 (2 例) 及び正常ヒトリン
パ球 (3 例) の各 R F X 1 遺伝子の第 7 イントロンの C p G のメチル化
の解析を行った。図 8 a, b に第 7 イントロンの C p G を示す。1 回目
の P C R 条件を、9 4℃で 5 分間変性させた後、9 4℃で 1 分間変性さ
15 せ、4 8℃で 2 分間アニーリングし、7 2℃で 2 分間伸長反応させると
いうサイクルを 4 5 回繰返し、最後に 7 2℃で 7 分間伸長反応を行うこ
と、及び 2 回目の P C R 条件を、9 4℃で 5 分間変性させた後、9 4℃
で 1 分間変性させ、5 0℃で 1 分間アニーリングし、7 2℃で 1 分間伸
長反応させるというサイクルを 4 5 回繰返し、最後に 7 2℃で 7 分間伸
長反応を行うこと以外は、上記バイサルファイト・ジェノミック・シー
20 クエンシングと同様に実施した。

実施例 1 G (ルシフェラーゼアッセイ)

R F X 1 の第 7 イントロンを P C R により単離し、pGL3-Promoter
luciferase vector (プロメガ社製) に組み込んだ。ここでの P C R にお
けるプライマー配列として、センスプライマー : 5'-GTG TGT CTC CCC
25 CTC CTA CCC CAC G-3' (配列番号 3 3)、アンチセンスプライマー :
5'-GGG GCA GAG GAA GGG CAC GTG GAG G-3' (配列番号 3 4) を用

いた。また、PCR反応条件は次の通りである：98℃で5分間変性させた後、98℃で1分間変性させ、68℃で2分間アニーリングし、72℃で2分間伸長反応させるというサイクルを40回繰返し、最後に72℃で7分間伸長反応を行った。得られたプラスミドを LipofectAMINE PLUSTM Reagent (Invitrogen 社製) を用いて、U251 グリオーマ細胞に遺伝子導入し、遺伝子導入から48時間後にルシフェラーゼアッセイを行った。ルシフェラーゼアッセイには Bright-Glo Luciferase Assay System (プロメガ社製) を用いた。ルシフェラーゼによって生じる生物発光は Wallac ARVOTM SX 1420 multilabel counter (Perkin Elmer life sciences 社製) を用いて検出した。

実施例 1 H (グリオーマ細胞の増殖抑制試験)

RFX1 遺伝子を U251 グリオーマ細胞に遺伝子導入するためのベクターとして、pFLAG-CMV-2 vector (シグマ社製) を用いた。RFX1 遺伝子は W.Reith 氏から提供を受けた。遺伝子導入には LipofectAMINE PLUSTM Reagent (Invitrogen 社製) を用いた。グリオーマ細胞の増殖の解析は、細胞のチミジンの取り込み能により行った。具体的には、遺伝子導入から24時間後、96ウェルプレートの各ウェルに5000個の細胞を加え、37℃、CO₂インキュベーター内で24時間培養し、続いて1ウェルにつき1μCiの [³H] チミジンを加え、さらに24時間後細胞を回収し、トップカウンターを用いて [³H] チミジンの取り込みを測定した。

実施例 2 [結果]

実施例 2 A (RLGS プロファイル)

図1Aに示すように、RLGS プロファイル上には約2500のスポットが観察されるが、今回は最も分解能が高い中心部の約400スポットを2例のグリオーマ (GB26 および GB30) と正常 (それぞれ対

応した患者血液) で比較解析した。この解析ではメチル化DNAを切断しない Not I をランドマークにRLGSを行ったため、正常と比較して異常にメチル化されたDNA領域に対応するスポットは消失あるいは信号が減弱する。本解析の結果、グリオーマ2例において共通して欠失および信号強度の減少した12個のスポットを同定した(図1Bおよび表1)。

表 1

クローン No.	クロモ ソーム	GC%	CpG比	関連遺伝子	位置	遺伝子機能
1	19	65	0.53	RFX1	イントロン	転写調節
2	15	54.4	0.77	—		
3	12	60.9	0.59	BGT-1	3'	神経伝達物質 トランスポーター
4	未特定					
5	5	63.8	0.67	ADAMTS2	イントロン	プロテアーゼ
6	2	64.6	0.94	HOXD9	5'	転写因子
7	9	63.8	0.59	—		
8	15	67.8	0.59	FKSG88	エクソン &イントロン	未知
9	14	58.3	0.78	CGI-112 タンパク質	5'	未知
10	X	67.3	0.61	—		
11	12	67.1	0.58	ALK-1	3'	細胞内シグナル伝 達 トランデュース
12	2	64.4	0.91	—		

10 実施例2B(グリオーマにおいてメチル化されたDNA断片の単離と同定)

グリオーマのRLGSプロファイルにおいて欠失していた12個のスポットを胎盤のRLGSトラップゲルから単離し、シーケンシングを行った結果、解析可能であった全てのクローン(11個)は、%GCとCpG ratio $\{(CpGs \text{ の数}) / (G \text{ アニンの数}) (シトシンの数)\} \times (\text{解析塩基数})$ の結果からCpGアイランドに相当することが明らか

になった(表1)。さらにこれら単離されたCpGアイランド近傍の遺伝子を検索するためBLAST searchを行ったところ、7つの遺伝子が同定された。例えばクローン1のDNA断片は、19番染色体のRFX1遺伝子の第7イントロン内に存在することが明らかになった(図2)。

5 実施例2C (RT-PCRによる遺伝子発現解析)

同定された7つの遺伝子の正常組織、グリオーマ組織、およびグリオーマ細胞株における発現をRT-PCRにより解析した結果、以下の3つの遺伝子は興味深い発現パターンを呈していた。RFX1遺伝子は正常組織では脳と精巣で発現が認められたが、グリオーマ組織(2/4)、
10 グリオーマ細胞株(5/5)において発現の欠失あるいは減少が観察された(図3)。同様にBGT-1遺伝子は正常組織では脳、肝臓、腎臓、精巣で発現が認められたが、グリオーマ組織(3/4)、グリオーマ細胞株(5/5)において発現の欠失あるいは減少が観察された(図4)。一方、HOXD9遺伝子は正常では主に脾臓、腎臓、精巣で発現し、脳で
15 の発現が認められなかったが、グリオーマ組織(3/4)、グリオーマ細胞株(3/5)において発現が認められた(図5)。

実施例2D (5-アザシチジン、トリコスタチンA処理による遺伝子再発現)

グリオーマにおけるRFX1およびBGT-1遺伝子の発現の減少あるいは消失とDNAのメチル化やヒストン脱アセチル化との関連性を調べるため、ヒトグリオーマ細胞株をメチル基転移酵素阻害剤である5-
20 アザシチジンとヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチンAでそれぞれ処理した後、あるいは両者で細胞を処理した後、それぞれの遺伝子の発現変化をRT-PCR法により解析した。その結果、コントロールと比較して、ヒトグリオーマU251細胞ではそれぞれの薬剤
25 処理によりRFX1遺伝子の発現上昇が認められ、両者の薬剤処理によ

りさらに発現の増強が認められた(図6)。同様にBGT-1遺伝子に関しても、4種類のグリオーマ細胞株において、様々な程度であるが、薬剤処理によりコントロールと比較して発現の上昇が観察された(図7)。以上の結果から、グリオーマにおけるRFX1およびBGT-1の発現

5 の減少がDNAのメチル化に関係することが示された。

実施例2E(RFX1遺伝子第7イントロンのメチル化の解析)

さらにRFX1の第7イントロンのCpGのメチル化の状態を詳しく調べるため、パイサルファイトシーケンスを行った。正常ヒト脳組織(2例)及び正常ヒトリンパ球(3例)の各RFX1遺伝子の第7イントロンのCpGのメチル化の解析結果を図9に、ヒトグリオーマ細胞株(U251、GI-1、T98G、U87MG)の各RFX1遺伝子の第7イントロンのCpGのメチル化の解析結果を図10に、ヒトグリオーマ組織(4例)の各RFX1遺伝子の第7イントロンのCpGのメチル化の解析結果を図11に、それぞれ示す。図9~11中において、●はメチル化を示し、○は非メチル化を示す。その結果、図9~11に示すように、正常脳組織やリンパ球と比較して、グリオーマ細胞株や組織ではRFX1遺伝子の第7イントロンのCpGに高頻度のメチル化が認められた。これらの結果から、各RFX1遺伝子の第7イントロンのメチル化状態を解析することでグリオーマの診断が可能となることがわかった。

実施例2F(RFX1遺伝子の第7イントロンのエンハンサー活性の解析)

上記RFX1遺伝子第7イントロンのメチル化の解析結果から、RFX1遺伝子の第7イントロンのメチル化によりRFX1遺伝子の発現が調節されていることが示唆されたため、RFX1第7イントロンのエンハンサー活性の解析をルシフェラーゼアッセイにより行った。結果を図

1 2に示す。図1 2に示すデータは、それぞれをコントロールであるp
GL 3プロモーター(S V 4 0のプロモーターが組み込まれたベクター)
の値で割ったもので表した。図1 2中、p GL 3コントロールはS V 4
0のプロモーターとS V 4 0のエンハンサーが組み込まれたベクター、
5 センスイントロンはS V 4 0のプロモーターとセンス方向のR F X 1 遺
伝子第7イントロンが組み込まれたベクター、アンチセンスイントロン
はS V 4 0のプロモーターとアンチセンス方向のR F X 1 遺伝子第7イ
ントロンが組み込まれたベクター、p GL 3 ベーシックはプロモーター
もエンハンサーも組み込まれていないベクターを示す。図1 2に示すよ
うに、R F X 1 遺伝子第7イントロンが組み込まれたベクターはセンス
10 方向およびアンチセンス方向ともに、S V 4 0プロモーターが単独で組
み込まれたベクターと比較して、高いルシフェラーゼの発光が認められ
たことから、R F X 1 遺伝子第7イントロンにはエンハンサー活性を有
することが明らかになった。

15 実施例2 G (R F X 1 によるグリオーマ細胞の増殖抑制)

R F X 1 と発現と腫瘍細胞増殖との関連性を検討するために、R F X
1 遺伝子をU 2 5 1 グリオーマ細胞に遺伝子導入した。まず、R F X 1
の発現を、抗R F X 1 抗体 (Saut Cruz Biotechnology 社製) を用いた
ウエスタンブロット法により確認した。図1 3 Aに示すように、U 2 5
20 1 グリオーマ細胞に何も導入しないコントロール及びベクターpFLAG-
CMV-2 のみを導入した細胞 (エンプティベクター) ではR F X 1 遺伝子
の発現は認められず、R F X 1 遺伝子を導入した細胞 (R F X 1 ベクタ
ー) でのみR F X 1 の発現が観察された。[³H] チミジンの取り込み量
を指標とした細胞増殖の解析結果を図1 3 Bに示す。その結果、U 2 5
25 1 グリオーマ細胞に何も導入しないコントロールやベクターpFLAG-
CMV-2 のみを導入した場合と比較して、R F X 1 遺伝子を導入した場合、

明らかな腫瘍細胞の増殖抑制が認められた。以上のことから、R F X 1 遺伝子はグリオーマにおいて癌抑制遺伝子として機能していることが明らかになった。また、R F X 1 は転写因子として、癌遺伝子の一つである c - m y c 遺伝子の発現を抑制することが知られていることから、

5 R F X 1 遺伝子が癌抑制遺伝子としてグリオーマの発生に関与していることが示唆される。以上のとおり、R F X 1 遺伝子は、メチル化状態、遺伝子発現、タンパク質発現を解析することでグリオーマの診断薬として有用であると同様に、グリオーマで発現が消失あるいは減少している R F X 1 遺伝子をグリオーマで発現させることにより、治療薬としても

10 有用であると考えられる。

実施例 2 H (H O X 遺伝子の発現解析)

H O X 遺伝子群は動物の発生時に機能し、個体の前後軸における分化特異性を決定する遺伝子である。これらの遺伝子群はホメオボックスと呼ばれる DNA 結合配列を有し、その発現は高度に調節されている。図

15 5 に示されるように、H O X D 9 遺伝子が異所性にグリオーマにおいて発現していることが明らかになった。さらに、本来、正常脳組織に発現していない他の H O X 遺伝子 (H O X D 8、H O X A 9、H O X B 9、H O X C 9) に関しても、グリオーマにおいて異所性に発現しているかどうかを R T - P C R 法により解析した結果、調べた上記の H O X 遺伝

20 子 (H O X D 8、H O X A 9、H O X B 9、H O X C 9) のいずれもが、正常人の脳では発現が認められなかったのに対して、グリオーマ細胞株において遺伝子の発現が観察された (図 1 4、図 1 5)。したがって、これら H O X 遺伝子は、メチル化されることにより、結果的に癌遺伝子としてグリオーマ (癌) の発生に関与していることが示唆された。以上の

25 結果から、異所性に発現する H O X 遺伝子群は、グリオーマを含む癌の診断薬や治療薬として有用であると考えられる。

次に、H O X D 群遺伝子のグリオーマにおける発現を網羅的に解析した結果を図 1 6 に示す。その結果、本来脳に存在する H O X D 1 のみならず、脳には存在しないその他の H O X D 群遺伝子（H O X D 3、H O X D 4、H O X D 9、H O X D 1 0、H O X D 1 1、H O X D 1 3）が
5 脳腫瘍で高発現していることが明らかになった。したがって、これら H O X D 1 を除く H O X D 群遺伝子は、メチル化されることにより、結果的に癌遺伝子としてグリオーマ（癌）の発生に関与していることが示唆された。以上の結果から、異所性に発現する H O X D 群遺伝子は、グリオーマを含む癌の診断薬や治療薬として特に有用であると考えられる。

10

産業上の利用可能性

本発明によると、ヒトグリオーマ等の癌の診断や治療に有用な R F X 1 遺伝子、B G T - 1 遺伝子等の癌抑制遺伝子あるいは H O X 遺伝子等の癌遺伝子を同定することができ、それら癌抑制遺伝子や癌遺伝子を標
15 的としたヒトグリオーマ等の癌の診断方法や診断薬、ヒトグリオーマ等の癌の治療方法や治療薬を提供することができる。

請 求 の 範 囲

1. ヒトグリオーマ又はヒトグリオーマ細胞株由来のジェノミックDNAと、正常組織由来のジェノミックDNAとにおけるCpGアイランド
5 のシトシン残基のメチル化の程度を比較することを特徴とする癌抑制遺伝子又は癌遺伝子のスクリーニング方法。
2. 癌抑制遺伝子又は癌遺伝子が、ヒトグリオーマの癌抑制遺伝子又は癌遺伝子であることを特徴とする請求項1記載の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子のスクリーニング方法。
- 10 3. ヒトグリオーマの癌抑制遺伝子が、RFX1遺伝子又はBGT-1遺伝子であることを特徴とする請求項2記載の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子のスクリーニング方法。
4. RFX1遺伝子として、RFX1遺伝子第7イントロンを用いることを特徴とする請求項3記載の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子のスクリー
15 ング方法。
5. ヒトグリオーマの癌遺伝子が、HOXD1、HOXD3、HOXD4、HOXD8、HOXD9、HOXD10、HOXD13、HOXA9、HOXB9又はHOXC9等のHOX遺伝子であることを特徴とする請求項2記載の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子のスクリーニング方法。
- 20 6. 請求項1～5のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子の、メチル化の程度、遺伝子変異の有無、遺伝子発現の程度、タンパク質発現の程度の少なくともいずれか1つを測定することを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の診断方法。
- 25 7. 請求項1～5のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子の、メチル化の程度、遺

伝子変異の有無、遺伝子発現の程度、タンパク質発現の程度の少なくともいずれか1つを測定することができる試薬を備えたことを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の診断薬。

5 8. 請求項1～4のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌抑制遺伝子を癌細胞で発現させるか、あるいは、前記癌抑制遺伝子の発現産物、メチル基転移酵素阻害剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の少なくともいずれか1つを癌患者に投与することを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の治療方法。

10 9. 請求項1～4のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌抑制遺伝子、前記癌抑制遺伝子の発現産物、メチル基転移酵素阻害剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の少なくともいずれか1つを含有することを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の治療薬。

15 10. 請求項1、2又は5記載のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌遺伝子の発現抑制剤又は該癌遺伝子の発現産物に特異的に結合するペプチド・タンパク質等の化合物を癌患者に投与することを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の治療方法。

20 11. 請求項1、2又は5記載のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌遺伝子の発現抑制剤又は該癌遺伝子の発現産物に特異的に結合するペプチド・タンパク質等の化合物を含有することを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の治療薬。

12. 請求項1～5のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子を標的としたことを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の診断又は治療方法。

25 13. RFX1遺伝子又はHGX遺伝子群を標的としたことを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の診断又は治療方法。

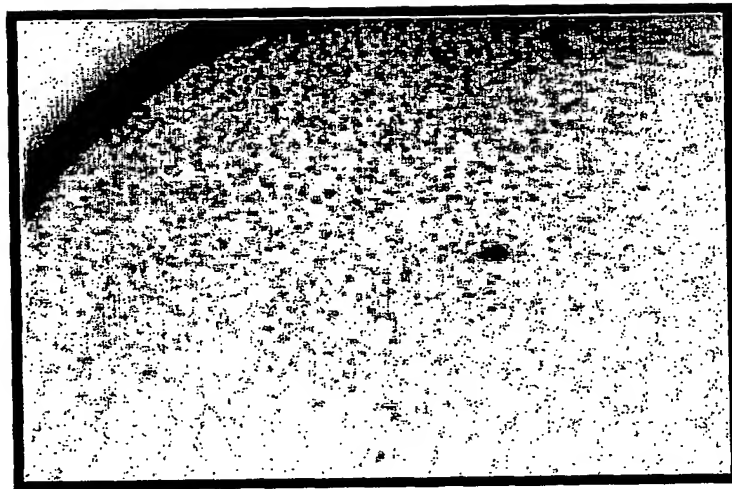
14. 請求項1～5のいずれか記載のスクリーニング方法により得られ

るヒトグリオーマ等の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子を標的としたことを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の診断又は治療薬。

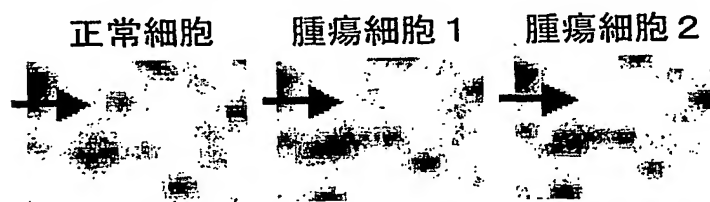
15. RFX1 遺伝子又はHOX 遺伝子群を標的としたことを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の診断又は治療薬。

第 1 図

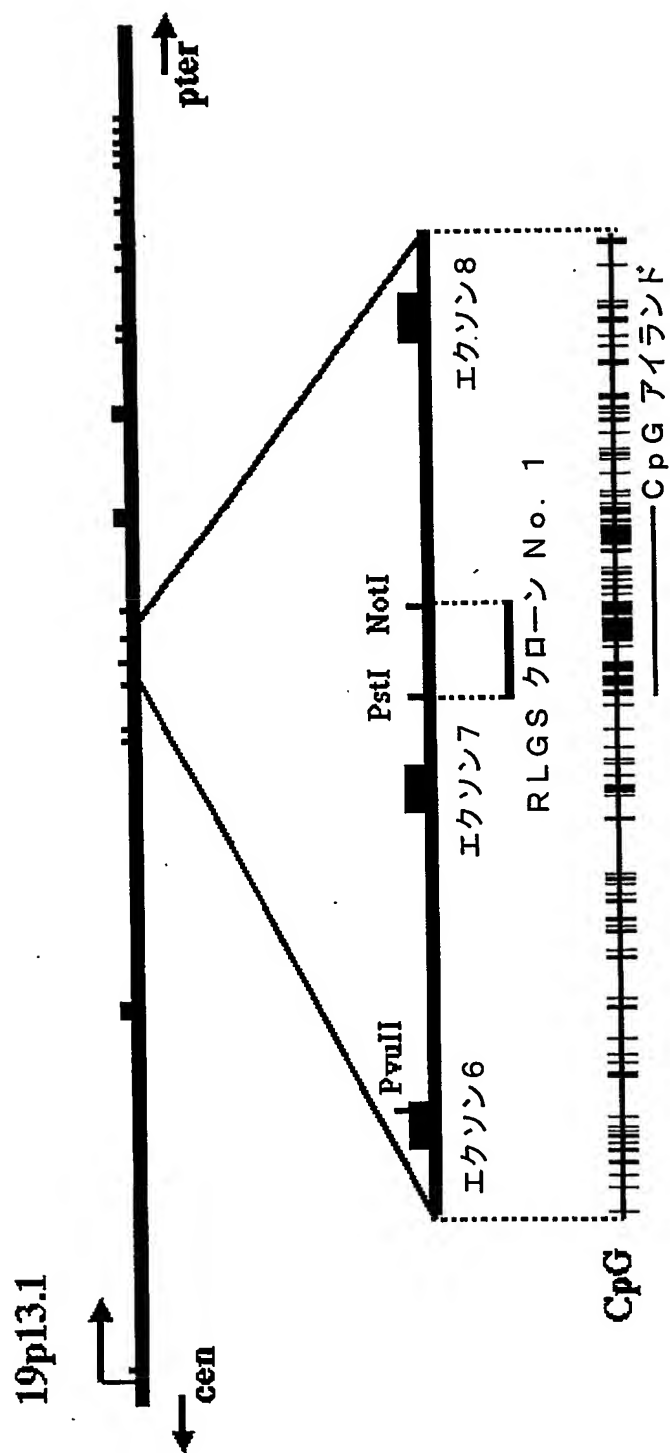
A



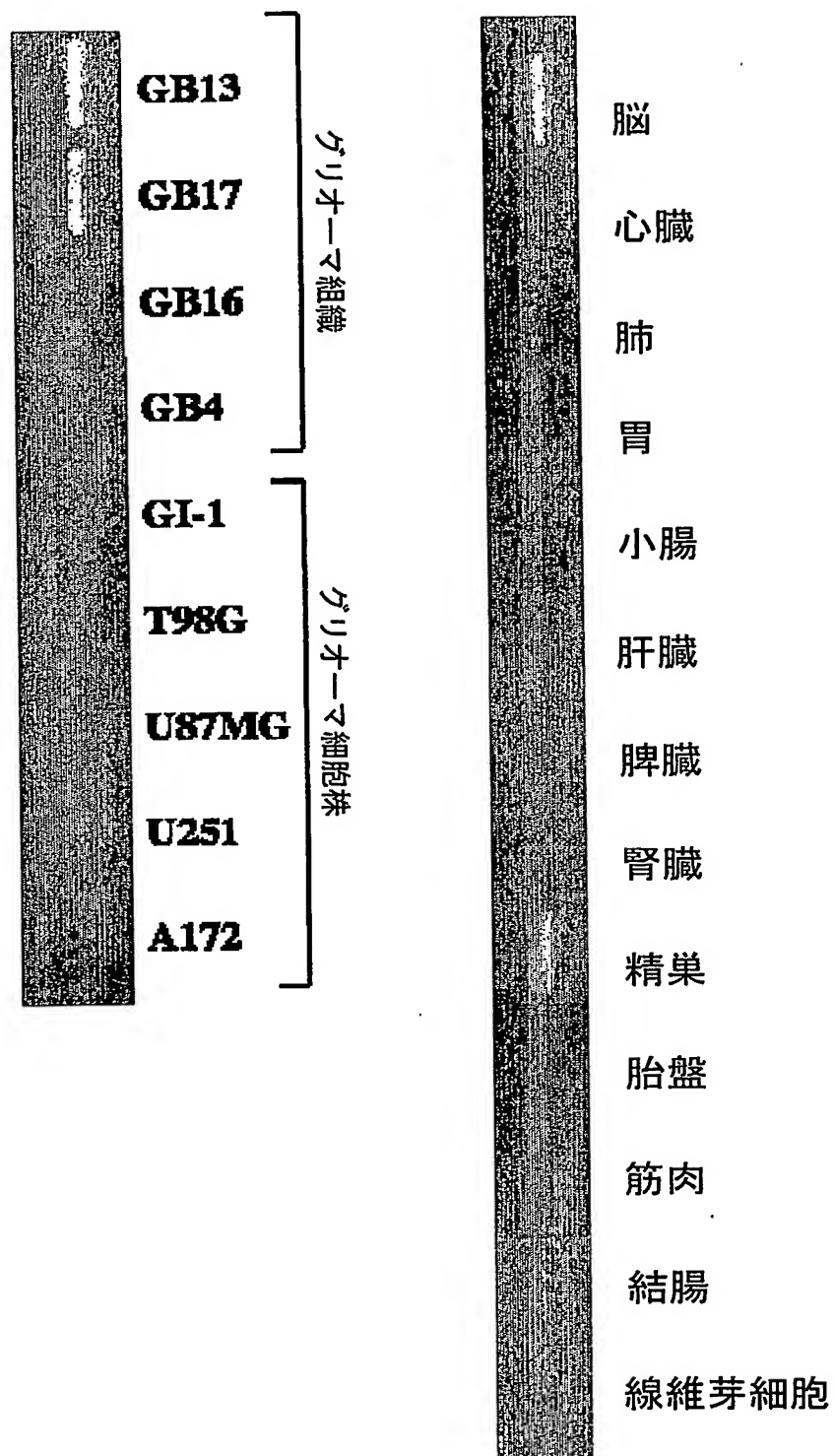
B



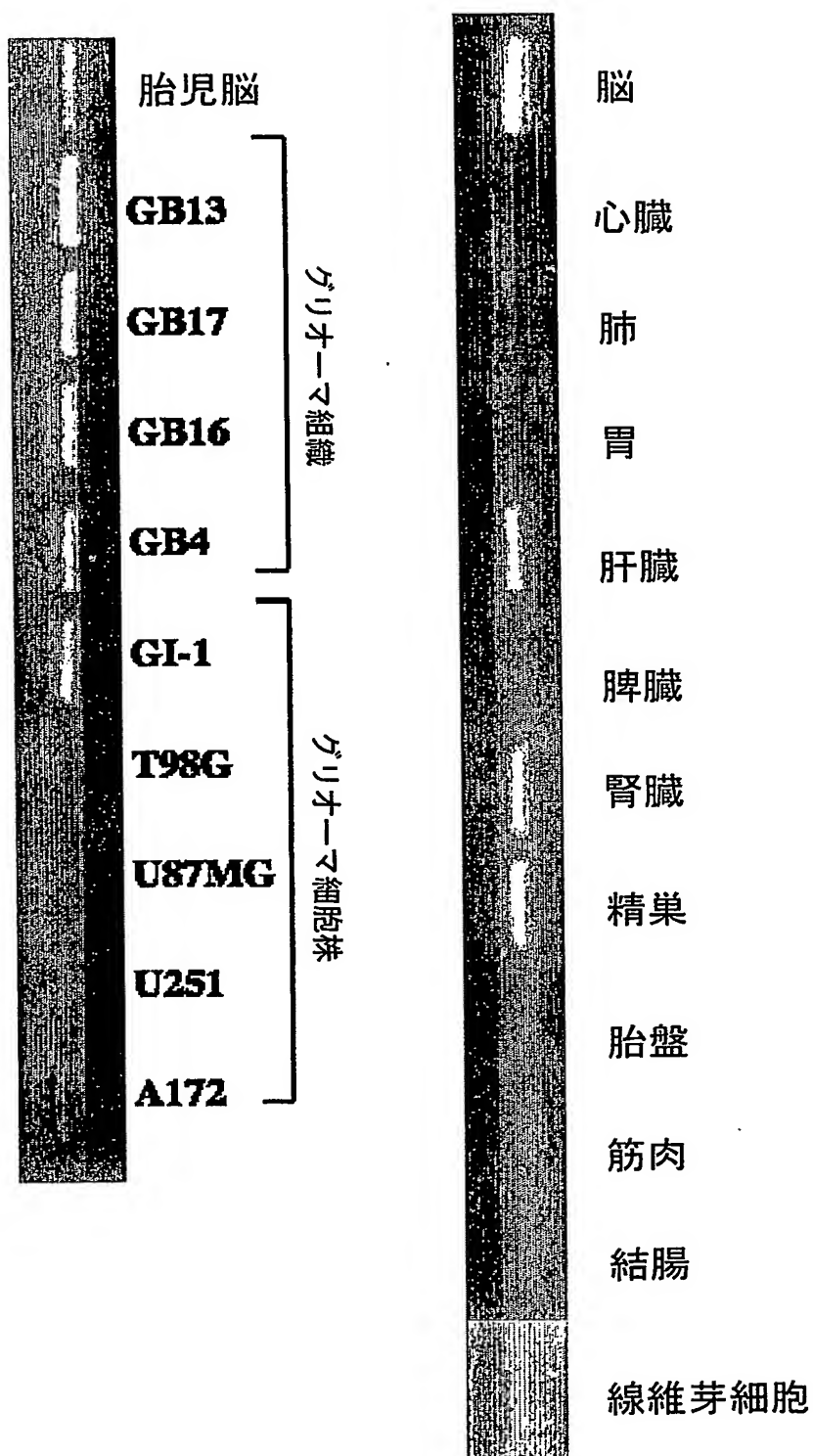
第 2 図



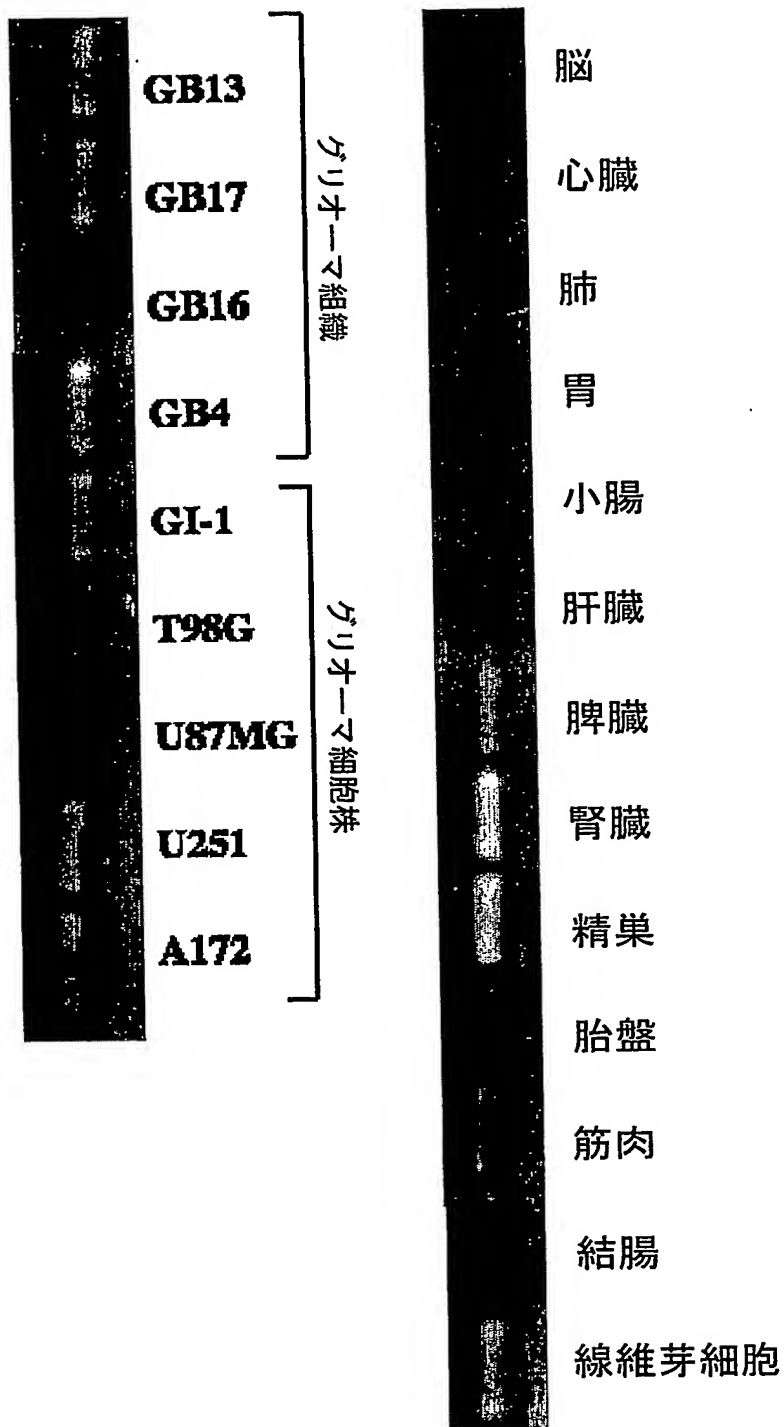
第 3 図



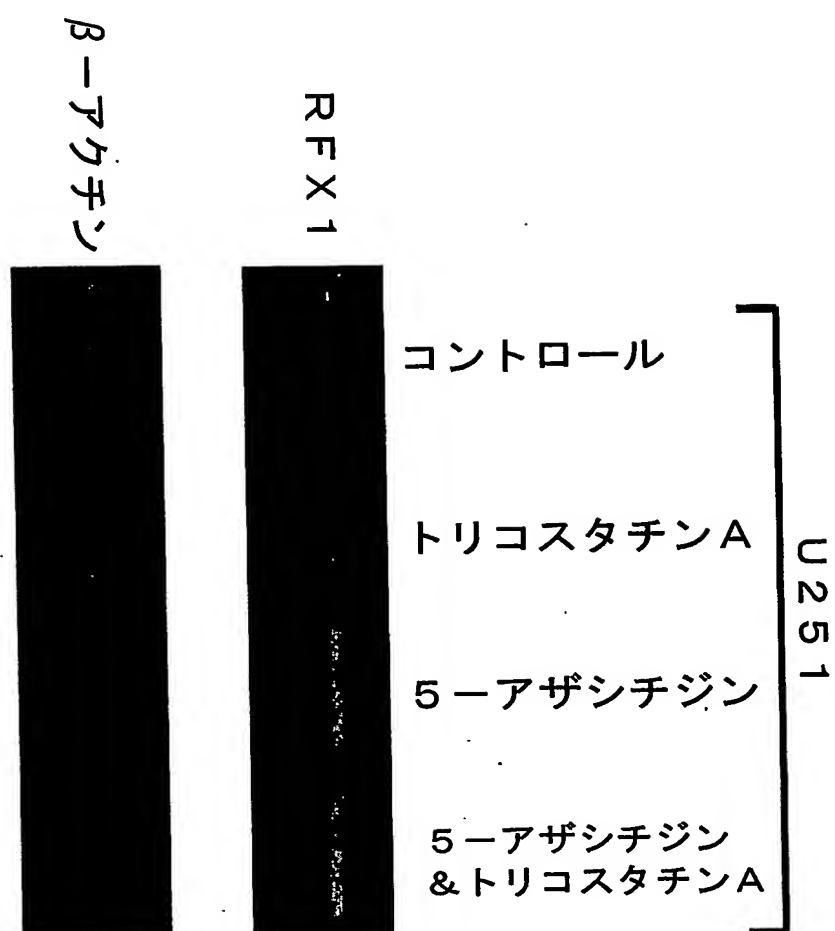
第 4 図



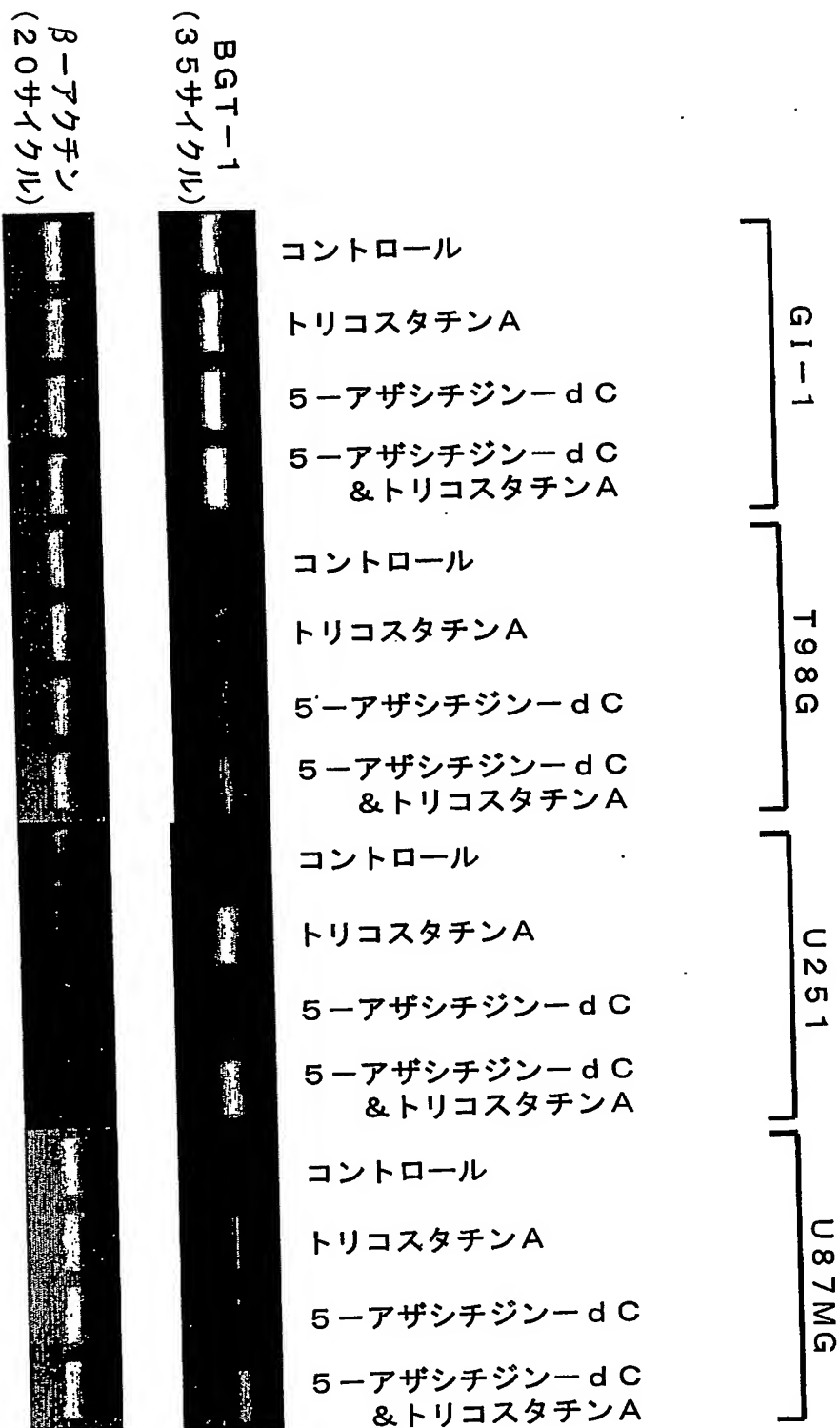
第 5 図



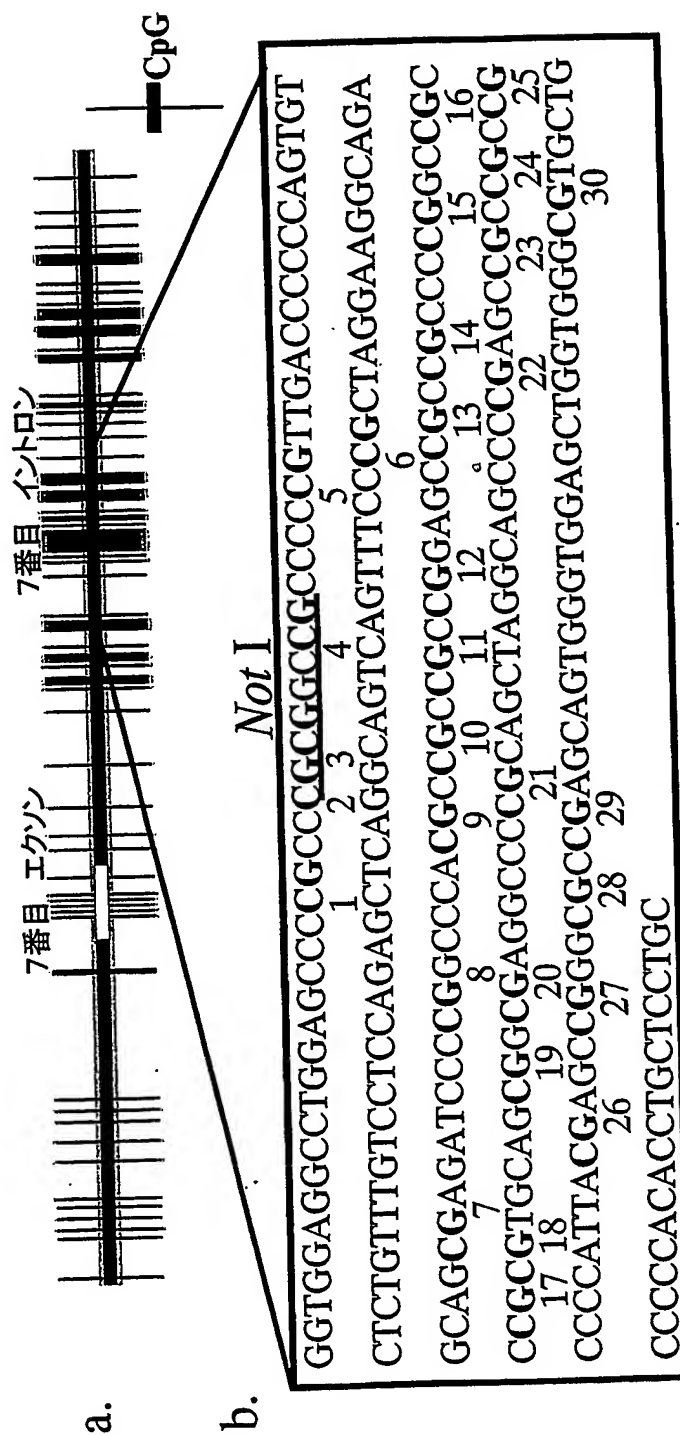
第 6 図



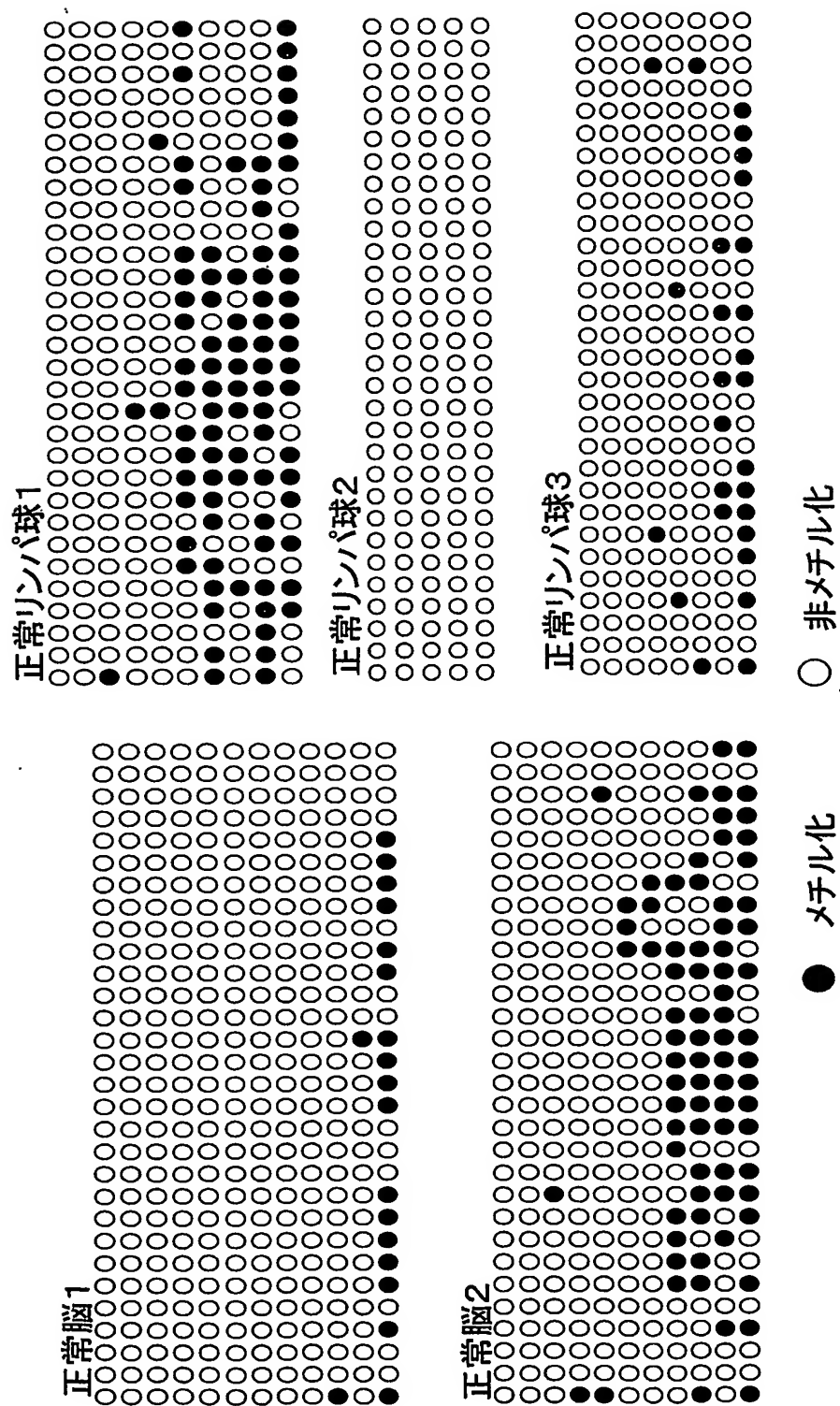
第 7 図



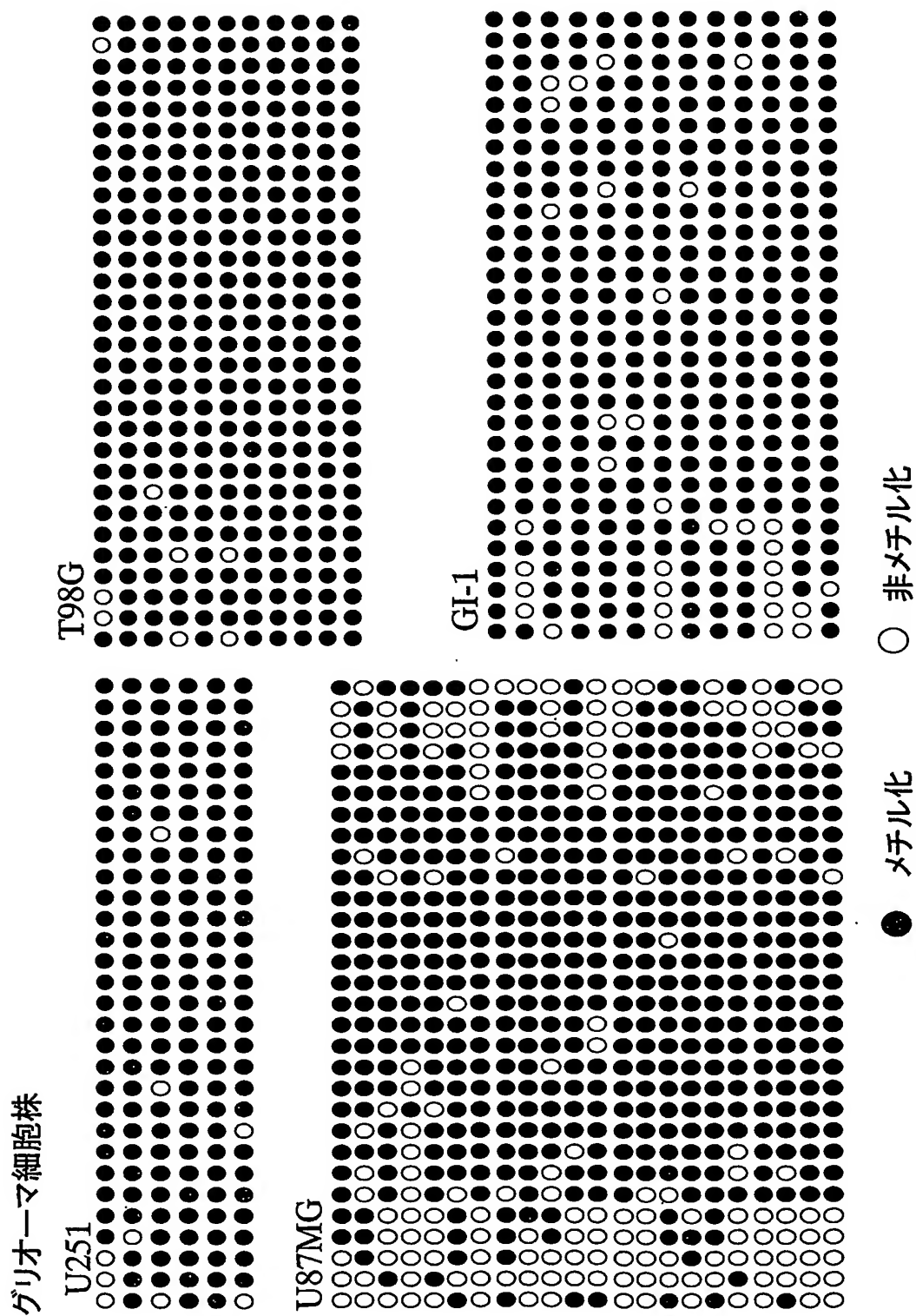
第 8 図



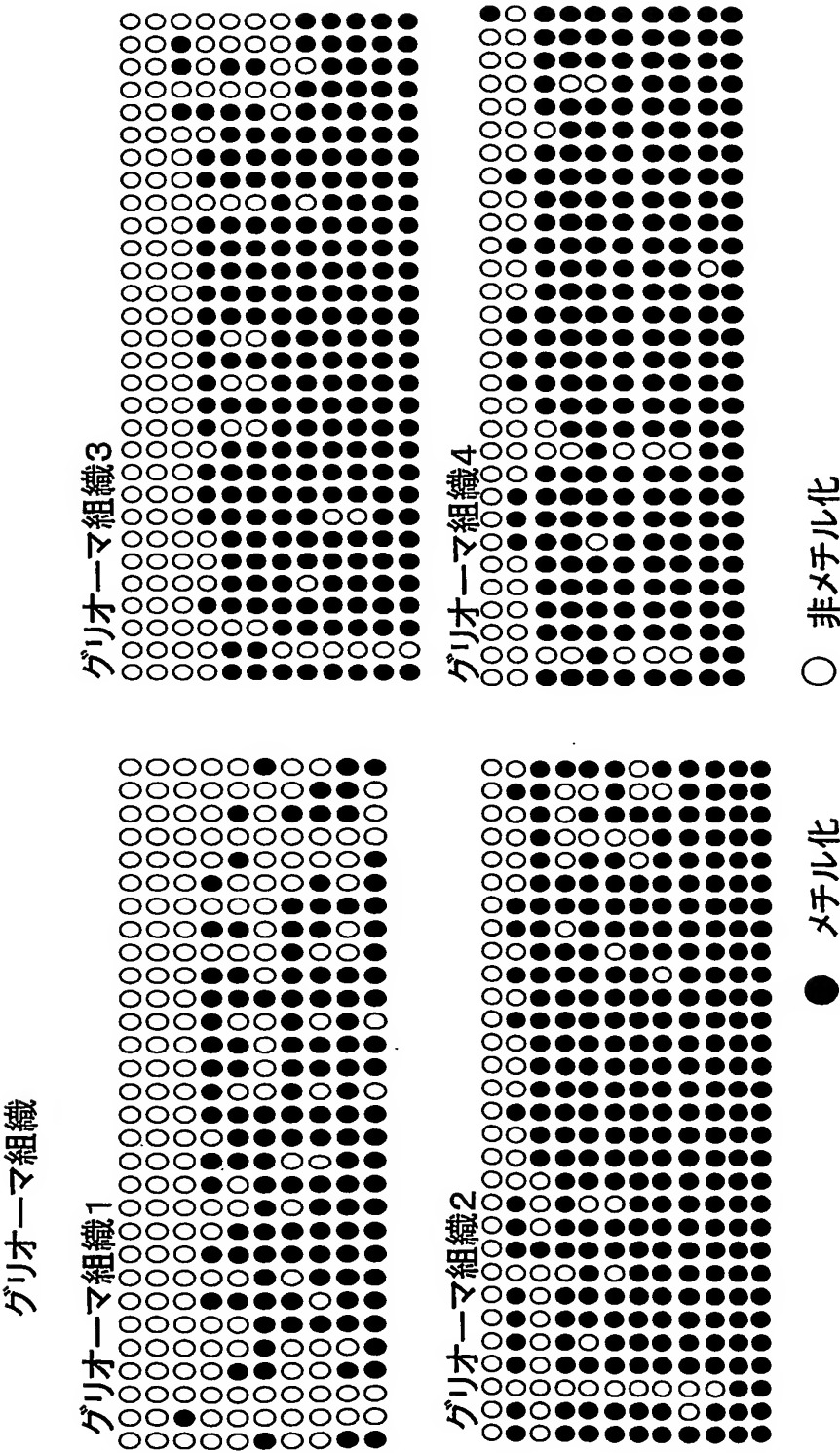
第 9 図



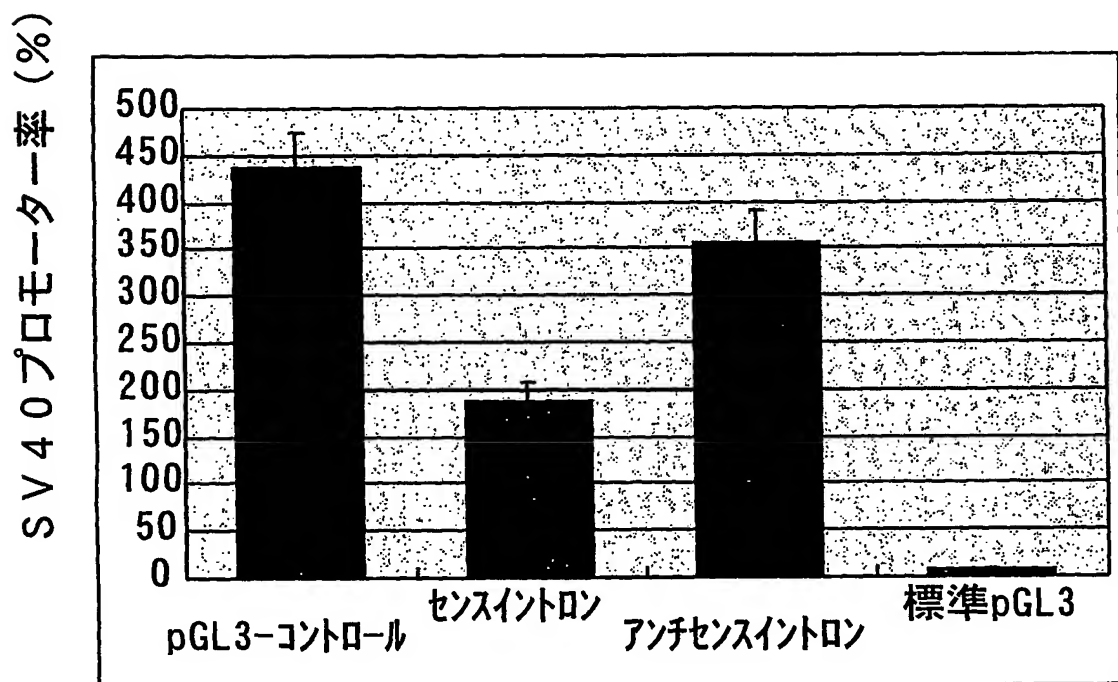
第 10 図



第 1 1 図



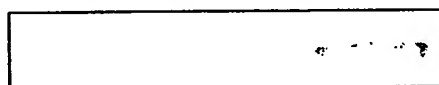
第 12 図



第 13 図

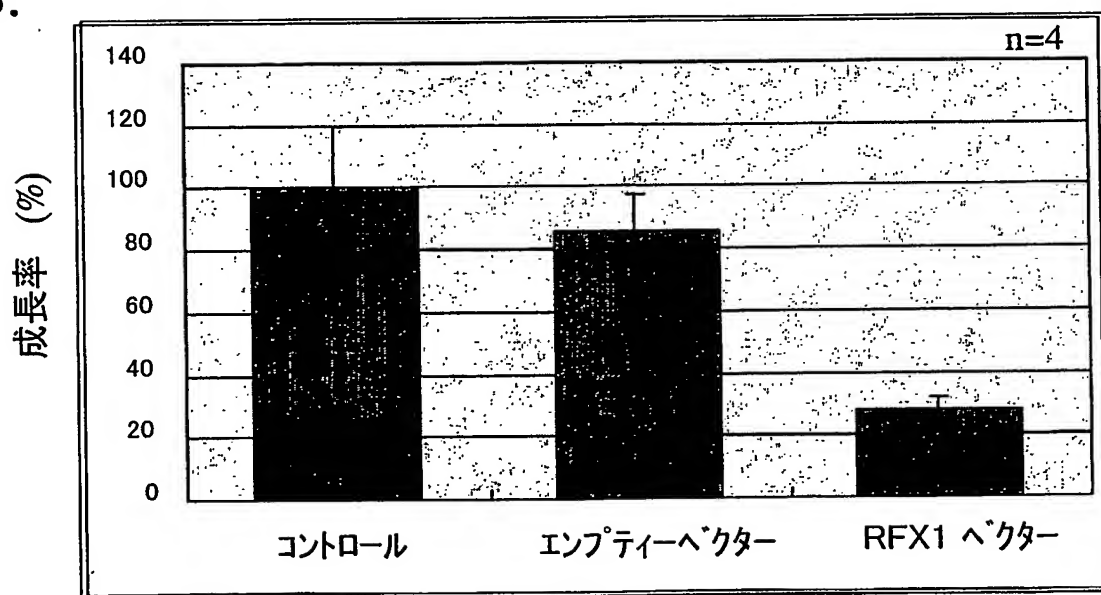
A.

ウェスタンブロッティング
コントロール エンptyベクター RFX1ベクター

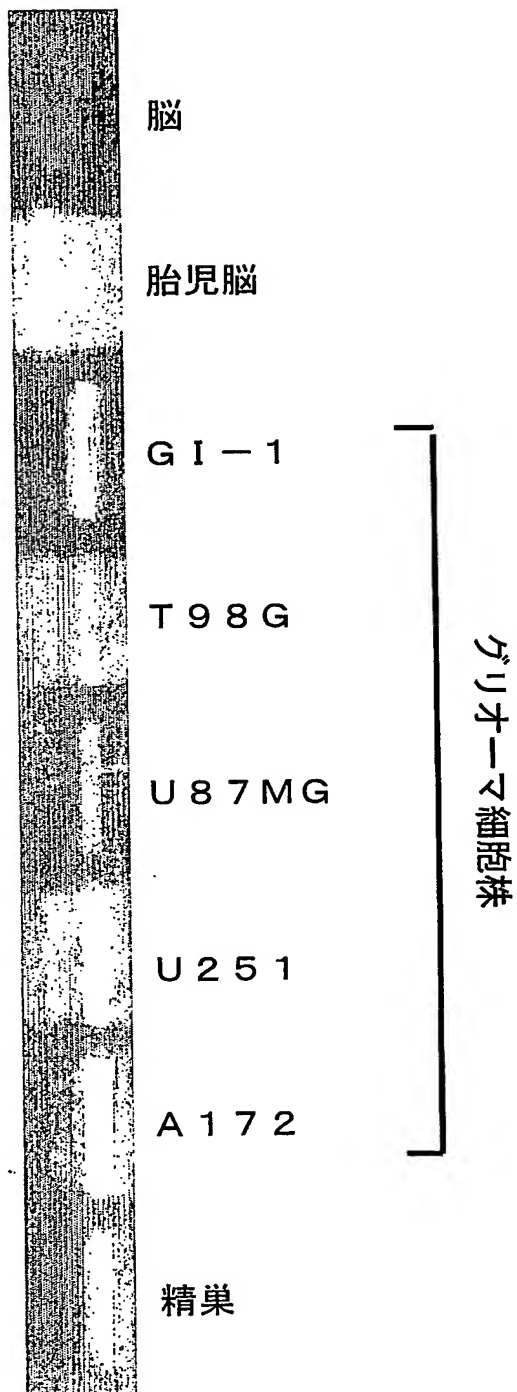


↑
RFX1 protein
140kDa

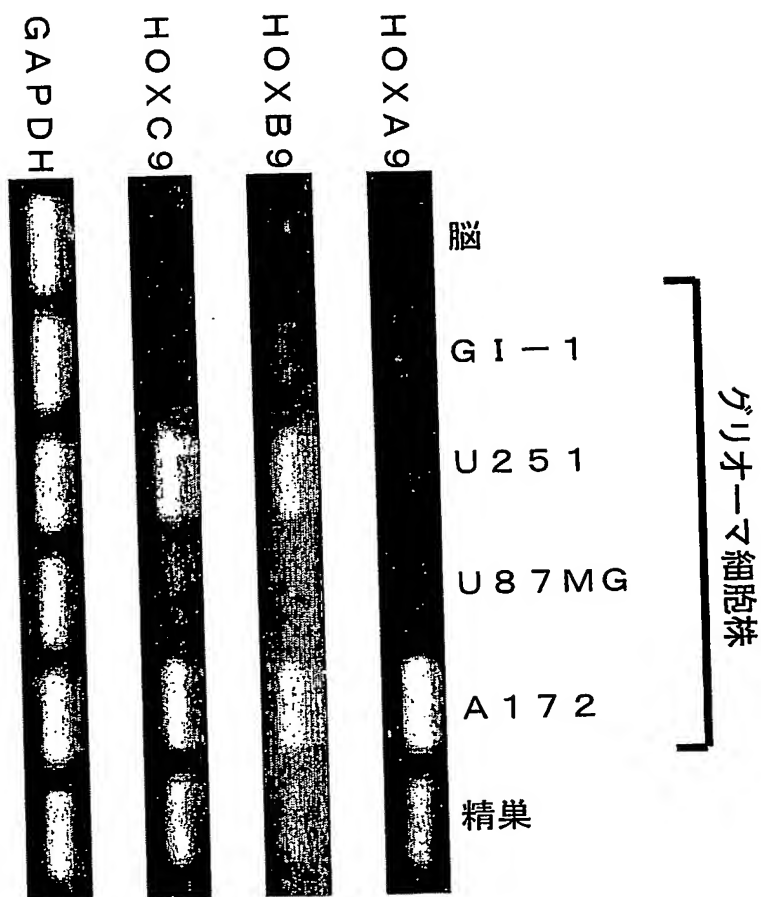
B.



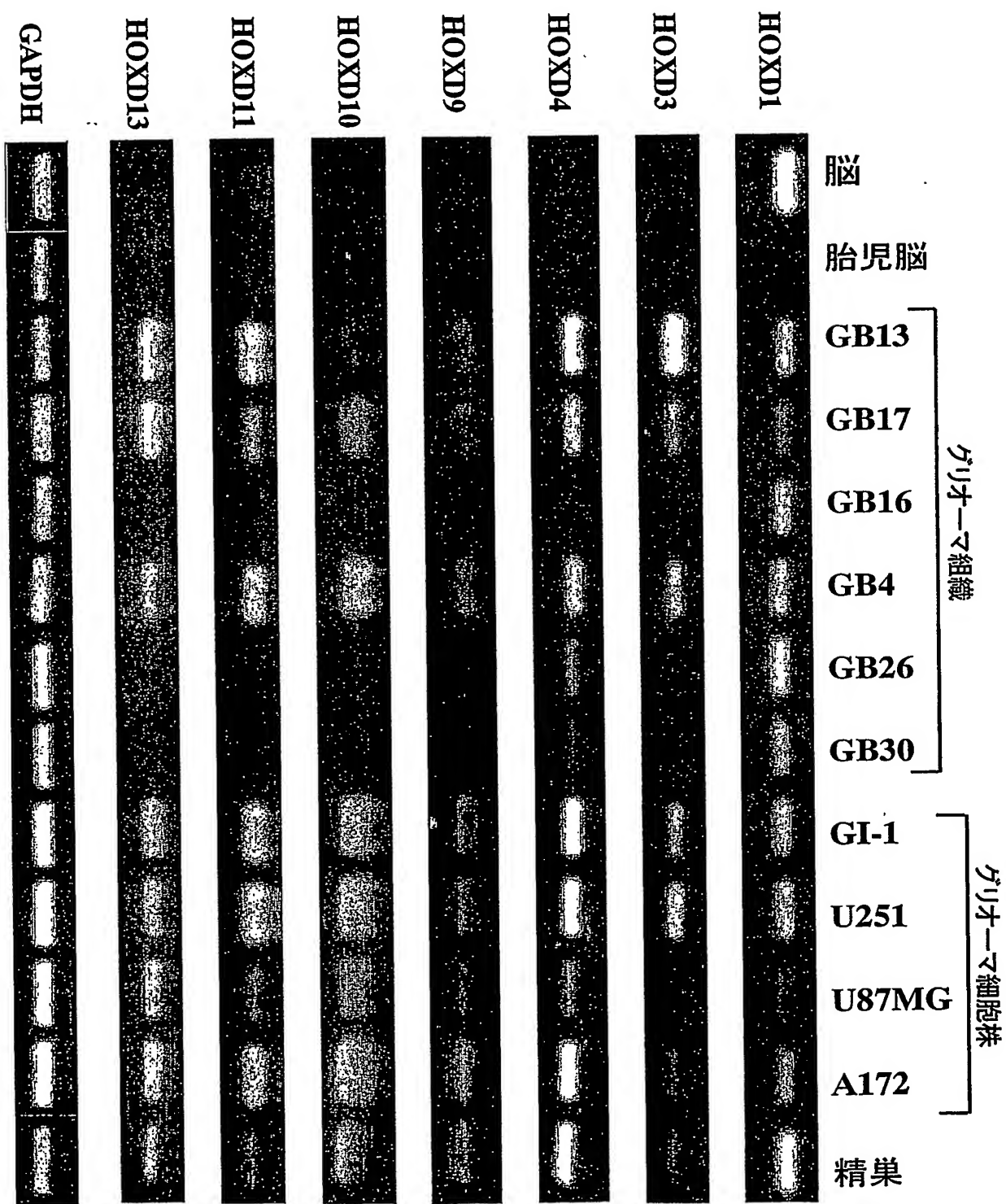
第 14 図



第 15 図



第 16 図



SEQUENCE LISTING

<110> KEIO UNIVERSITY

<120> Diagnostic and therapeutic pharmaceutical for malignant
brain cancer

<130> P10000282

<140>

<141>

<150> JP P2002-57926

<151> 2002-03-04

<160> 34

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:RFX1 sense primer

<400> 1

gaagatggaa ggcatgacc

19

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:RFX1 antisense
primer

<400> 2

ggctcttggc aaagtacc

18

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HOXA9 sense primer

<400> 3

cgaaggcgcc ttctccgaaa

20

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HOXA9 antisense
primer

<400> 4

aaatggcatc acicgtcttt tgctc

25

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HOXB9 sense primer

<400> 5

cacgcccgag tacagttagg

20

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HOXB9 antisense
primer

<400> 6

gacttgcttc tcactcagat tgagg

25

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HOXC9 sense primer

<400> 7

ggcagcaagc acaaagagga

20

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HOXC9 antisense
primer

<400> 8

aggctgggta gggtttaggac

21

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HOXD9 sense primer

<400> 9

cttgacccaa acaacccc

18

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HOXD9 antisense
primer

<400> 10

ctctctgtta gggtgagaat cc

22

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HOXD8 sense primer

<400> 11

gccaggagta ctccacc

18

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HOXD8 antisense
primer

<400> 12

gtttccccgt ccttcacc

18

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:BGT-1 sense primer

<400> 13

gagcattgca cggactttct gaacc

25

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:BGT-1 antisense
primer

<400> 14

ccaggatgga gaagacaaca aaccc

25

<210> 15

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:GAPDH sense primer

<400> 15

tgaacgggaa gcicactgg

19

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:GAPDH antisense primer

<400> 16

tccaccaccc tgttgctgta

20

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:beta-actin sense primer

<400> 17

gtcgacaacg gctccggcat gtgc

24

<210> 18

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:beta-actin antisense
primer

<400> 18

ggatcttcat gaggtagtca gtcag

25

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:RFX-1 7th intron sense primer

<400> 19

ggttttgggt tagttttaat tttt

24

<210> 20

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:RFX-1 7th intron antisense
primer

<400> 20

ttctctaaat cctaaccctc taa

23

<210> 21

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:RFX-1 7th intron sense primer

<400> 21

ggtaggaggtt tggagttt

18

<210> 22

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:RFX-1 7th intron antisense
primer

<400> 22

acaaaaacaa atataaaaac aaca

24

<210> 23

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HOXD1 sense
primer

<400> 23

acccaagtc cgicctc

18

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HOXD1 antisense
primer

<400> 24

agcagtggc tatctgatg

20

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HOXD3 sense
primer

<400> 25

ccaacagcaa gcagatcttc c

21

<210> 26

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HOXD3 antisense
primer

<400> 26

tcttgatcig gcgttccgt

19

<210> 27

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HOXD4 sense
primer

<400> 27

ggatgaagaa gg'gcacgtg aattcgg

27

<210> 28

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HOXD4 antisense
primer

<400> 28

gggtcccccac ttctataagg tcgtca

26

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HOXD10 sense

primer

<400> 29

ccaaggcggc cttcccgaag a

21

<210> 30

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HOXD10

antisense primer

<400> 30

tcggcgggtt tgaaaccaa tcttgacc

28

<210> 31

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HOXD13 sense

primer

<400> 31

ggcctacatc lccaaggagg gglacca

27

<210> 32

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HOXD13

antisense primer

<400> 32

gtggccaacc tggaccacat caggag

26

<210> 33

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:RFX1 7th intron sense

primer

<400> 33

gtgtgtctcc ccttctacc ccacg

25

<210> 34

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:RFX1 7th intron antisense
primer

<400> 34

ggggcagagg aagggcacgt ggagg

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02489

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/00, A61K38/45, A61K45/00, A61K48/00,
A61K31/7088, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/00, A61K38/45, A61K45/00, A61K48/00,
A61K31/7088, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE/CAPLUS/BIOSIS/WPIDS (STN)
JSTPlus/JST7580 (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Dong, S.M. et al., "Concurrent hypermethylation of multiple genes is associated with grade of oligodendroglial tumors", Journal of Neuropathology and Experimental Neurology, (2001 Aug.), Vol.60, No.8, pages 808 to 816, abstract; Discussion	1-5,8,9
X	Costello, J.F. et al., "Aberrant methylation of genes in low-grade astrocytomas", Brain Tumor Pathology, (2000), Vol.17, No.2, pages 49 to 56, abstract; Discussion	1-5,8,9
Y	NAKAMURA, T. et al., "Cooperative activation of Hoxa and Pbx1-related genes in murine myeloid leukaemias", Nature Genetics, (1996 Feb.), Vol.12, No.2, pages 149 to 153, abstract	5,8,9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
02 June, 2003 (02.06.03)

Date of mailing of the international search report
17 June, 2003 (17.06.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

International application No.

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02489

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 6, 8, 10, 12, 13

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The above claims pertain to methods for treatment of the human body by therapy or diagnostic methods and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) (continued to extra sheet)

2. ☒ Claims Nos.: 6, 7, 10-15 and parts of 8 and 9

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

(See extra sheet.)

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02489

Continuation of Box No.I-1 of continuation of first sheet(1)

of the Regulations under the PCT, to search.

Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

It cannot be preliminarily understood what specific structures the tumor suppressive genes or cancer genes and the peptides, proteins, etc. capable of specifically binding to expression inhibitors therefor or the expression products of the cancer genes as set forth in claims 6, 7, 10 and 11, as a whole, and parts of claims 8 and 9 have. Thus, these claims are extremely unclear.

Concerning claims 12 to 15, the targets are exclusively specified but it is not stated even what active ingredient is contained therein. Since it cannot be considered as a common technical knowledge for a person skilled in the art, claims 12 to 15 are extremely unclear.

Such being the case, claims 6, 7 and 10 to 15, as a whole, and parts of claims 8 and 9 fail to comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out (PCT Article 17 (2) (a) (ii)).

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/00, A61K38/45, A61K45/00,
A61K48/00, A61K31/7088, A61P35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/00, A61K38/45, A61K45/00,
A61K48/00, A61K31/7088, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE/CAPLUS/BIOSIS/WPIDS (STN)
JSTPlus/JST7580 (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Dong, S.M. et al., "Concurrent hypermethylation of multiple genes is associated with grade of oligodendroglial tumors" JOURNAL OF NEUROPATHOLOGY AND EXPERIMENTAL NEUROLOGY, (2001 Aug), Vol. 60, No. 8, pp. 808-816, 要約及びDiscussion参照	1-5, 8, 9
X	Costello, J.F. et al., "Aberrant methylation of genes in low-grade astrocytomas" BRAIN TUMOR PATHOLOGY, (2000), Vol. 17, No. 2, pp. 49-56, 要約及びDiscussion参照	1-5, 8, 9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献。

国際調査を完了した日

02.06.03

国際調査報告の発送日

17.06.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新留 豊



4B

9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Nakamura, T. et al., "Cooperative activation of Hoxa and Pbx1-related genes in murine myeloid leukaemias" NATURE GENETICS, (1996 Feb), Vol.12, No.2, pp.149-153, 要約参照	5, 8, 9
Y	Cillo, C. et al., "Homeobox genes and cancer" EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, (1999), Vol.248, No.1, pp.1-9, 要約参照	5, 8, 9
PX	Ohashi, Y. et al., "Identification of an epigenetic silenced gene, RFX1, in human glioma using the restriction landmark genomic scanning" PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, (March, 2002), Vol.43, pp. 1116, Abst. no.5531 参照	1-5, 8, 9
PX	Shiraishi, M. et al., "A comprehensive catalog of CpG islands methylated in human lung adenocarcinomas for the identification of tumor suppressor genes" ONCOGENE, (2002 May 23), 21 (23) 3804-3813,	1-5, 8, 9

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 6, 8, 10, 12, 13 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
上記請求の範囲は、人体の治療方法ないし診断方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☒ 請求の範囲 6, 7, 10-15及び8, 9(一部) は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
(別紙参照)
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第 I 欄 2. の続き

請求の範囲 6, 7, 10, 11 の全部, 並びに請求の範囲 8 及び 9 の一部に記載の癌抑制遺伝子または癌遺伝子、その発現抑制剤又は該癌遺伝子の発現産物に特異的に結合するペプチド・タンパク質等がいかなる具体的構造を有するのか事前に把握し得ないため、これらの請求の範囲は著しく不明確である。

また、請求の範囲 12-15 については、標的のみ特定され、有効成分として何が含まれるべきかすら記載されておらず、当業者の技術常識であるとも認められないので、請求の範囲 12-15 は著しく不明確である。

したがって、請求の範囲 6, 7, 10-15 の全部、並びに請求の範囲 8, 9 は有意義な国際調査をなし得る程度にまで所定の要件を満たしていない。(PCT17条(2)(a)(ii))

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.